

**Die Untersuchung des ADP / ATP - Carriers mit
einem fluoreszierenden Analog des ADP**

Carsten Graue

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0106

Die Untersuchung des ADP / ATP - Carriers mit
einem fluoreszierenden Analog des ADP

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereiches Physik

der

Ludwig - Maximilians - Universität München



vorgelegt von

Carsten Graue

aus

Hahnenklee

München, September 1976

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Brandmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 02. 1977



INHALTSVERZEICHNIS

=====

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	3
2. Beschreibung der Meßapparaturen	9
2.1. Messung der Fluoreszenzspektren	9
2.2. Messung der Fluoreszenzpolarisation	9
2.3. Messung der Fluoreszenzabklingzeiten	15
2.3.1. Auswahl der Meßmethode	15
2.3.2. Apparatur zur Messung der Abklingzeiten	17
2.3.2.1. Grundsätzlicher optischer Aufbau	17
2.3.2.2. Blitzlampe	19
2.3.2.3. Meßelektronik	20
2.3.2.4. Ein systematischer Fehler der Meß- methode und seine Korrektur	23
2.3.2.5. Praktische Durchführung der Messungen	25
2.3.3. Auswertung der Messung von Fluoreszenz- abklingzeiten	26
2.3.3.1. Einfluß der Ansprechzeit der Apparatur	26
2.3.3.2. Spektrale Korrektur der Meßkurven	27
2.3.3.3. Mathematische Methoden zur Bestimmung der Abklingfunktion $f(t)$	29
2.3.3.4. Methode der Momente	30
2.3.3.5. Anpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate	32
3. Theorie der Fluoreszenz	34
4. Die Messung der Bindung des FDP und FTP an Enzymen und dem AdN - Carrier	41
4.1. Änderung der Quantenausbeute	41
4.2. Änderung der Polarisation	42
4.3. Fluoreszenzübertragung	53
4.3.1. Theorie der Fluoreszenzübertragung	53
4.3.2. Anwendung auf den AdN - Carrier	59

	Seite
4.4. Messung der Abklingzeiten des gebundenen FDP	73
4.5. Messung der Rotationsdepolarisation des gebundenen FDP	77
4.6. Zusammenfassung	79
5. Anhang	81
5.1. Erläuterung des Programms zur Bestimmung der Abklingzeiten nach der Methode der Momente	81
5.2. Präparation der Rinderherzmitochondrien	94
5.3. Präparation des 9 - Anthracenmaleinimids	95
6. Literaturverzeichnis	97
7. Verzeichnis aller benutzter Abkürzungen	99

1. Einleitung

Ein grundlegender biologischer Prozeß ist die Umwandlung der durch Oxydation von Stoffwechselprodukten gewonnenen Energie in vom Organismus nutzbare chemische Energie. Die biologische Oxydation ist im ersten Schritt eine Dehydration und der freigesetzte Wasserstoff bzw. seine Elektronen werden durch ein Multienzymsystem - die sogenannte Atmungskette - übertragen. Erst im zweiten Schritt kommt es am Ende der Atmungskette zur Oxydation unter Beteiligung des Luftsauerstoffs. Auf noch nicht geklärte Weise sind die Reaktionen der Atmungskette an die Bildung des energiereichen Adenosintriphosphats (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) gekoppelt. ATP ist ein Träger chemischer Energie, die bei sehr vielen physiologisch wichtigen Prozessen, wie etwa einer Muskelkontraktion, verbraucht wird.

Die Enzyme der Atmungskette sind in der Membran der Mitochondrien lokalisiert, die eine Untereinheit der Zellen sind. Erstaunlich ist dabei die Tatsache, daß die Neubildung des ATP an der Innenseite der Membran stattfindet. ATP, ADP und P_i müssen also die Mitochondrienmembran passieren. Die Membran besteht im wesentlichen aus einer Doppelschicht von Phospholipiden. Diese im Innern stark hydrophobe Schicht ist für Wasser unpassierbar und das gleiche sollte auch für gut wasserlösliche Substanzen wie ADP, ATP und P_i gelten. Durch Untersuchungen mit radioaktiv markierten ADP und P_i ist aber nachgewiesen, daß diese Moleküle als Ganzes durch die Membran gelangen. Dies ist besonders für die relativ großen Adennucleotide ADP und ATP nicht unbedingt zu erwarten. Im folgenden wird dieser Transport allein untersucht, da er durch seine hohe Spezifität und Aktivität ein besonders gutes Beispiel für Membrantransportvorgänge ist.

Es wäre vorstellbar, daß ADP und ATP auf verschiedenen Wegen durch die Membran gelangen. Dagegen spricht aber, daß der Transport von den gleichen Inhibitoren blockiert wird. Ebenso zeigen Untersuchungen der Transportrate, daß ADP und ATP an eine gemeinsame Bindungsstelle binden.

Für den Mechanismus des Transports von ADP und ATP sind verschiedene Modelle denkbar.

- a) Die Membran besitzt "spezifische Poren", durch die die Moleküle hindurchdiffundieren können. Die Moleküle bleiben damit auch während des Transports in einer wäßrigen Phase.
- b) ADP oder ATP binden an ein Protein und werden dadurch vollkommen von der hydrophoben Membran abgeschirmt. Das Protein bewegt dann die Moleküle durch die Membran und gibt sie an der anderen Seite frei. Solche Transportproteine werden auch Carrier genannt; der Carrier für die Adeninnucleotide ADP und ATP wäre dann der AdN - Carrier.

Der Carrier wird im einfachsten Fall durch die Membran diffundieren. Transportprozesse dieser Art sind für eine Reihe von Ionentransporten nachgewiesen worden. Grundsätzlich ist es aber auch möglich, daß der Carrier in der Membran fest orientiert ist. Nach der Bindung von ADP oder ATP müßte er dann eine Konformationsänderung durchmachen und dabei die Moleküle durch die Membran schieben.

Durch das zweite Modell wäre die Tatsache leicht erklärt, daß der Transport der Adeninnucleotide ein reiner Gegentausch ist. Ein im Innern der Mitochondrien befindliches Molekül wird nur gegen ein äußeres Molekül ausgetauscht. Eine Akkumulation der Adeninnucleotide innerhalb oder außerhalb der Mitochondrien findet nicht statt. Dies wäre allerdings auch schon damit erklärbar, daß die Adeninnucleotide mehrfach negativ geladen sind. Ein einseitig gerichteter Transport würde ein Membranpotential aufbauen und so von selbst zum Erliegen kommen.

Eine naheliegende Untersuchungsmethode für den AdN-Carrier ist die Messung der Bindungskonstanten und Transportraten mit radioaktiv markierten ATP und ADP. Aussagen über die chemische Natur der Bindungsstelle oder die Beweglichkeit des Carriers in der Membran sind jedoch hierdurch nicht möglich.

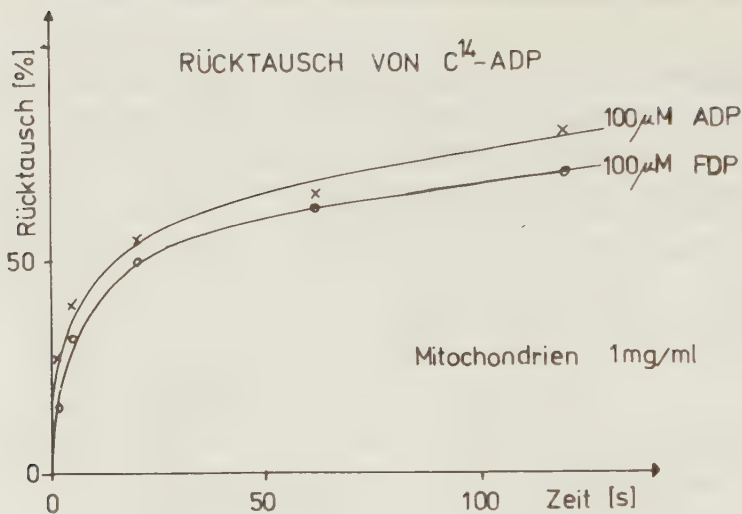


Bild 2 Rücktausch von C^{14} - ADP aus Rinderherzmitochondrien
gestartet durch ADP oder FDP bei $0^{\circ}C$.

Das Anregungsspektrum des FDP fällt aber mit dem Anregungsspektrum des Tryptophan fast zusammen, das in allen Proteinen und natürlich auch in der Mitochondrienmembran enthalten ist. Bild 3 zeigt die Anregungs- und Emissionsspektren der Mitochondrien und des FDP. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß beide Anregungsspektren gleiche maximale Intensität haben.

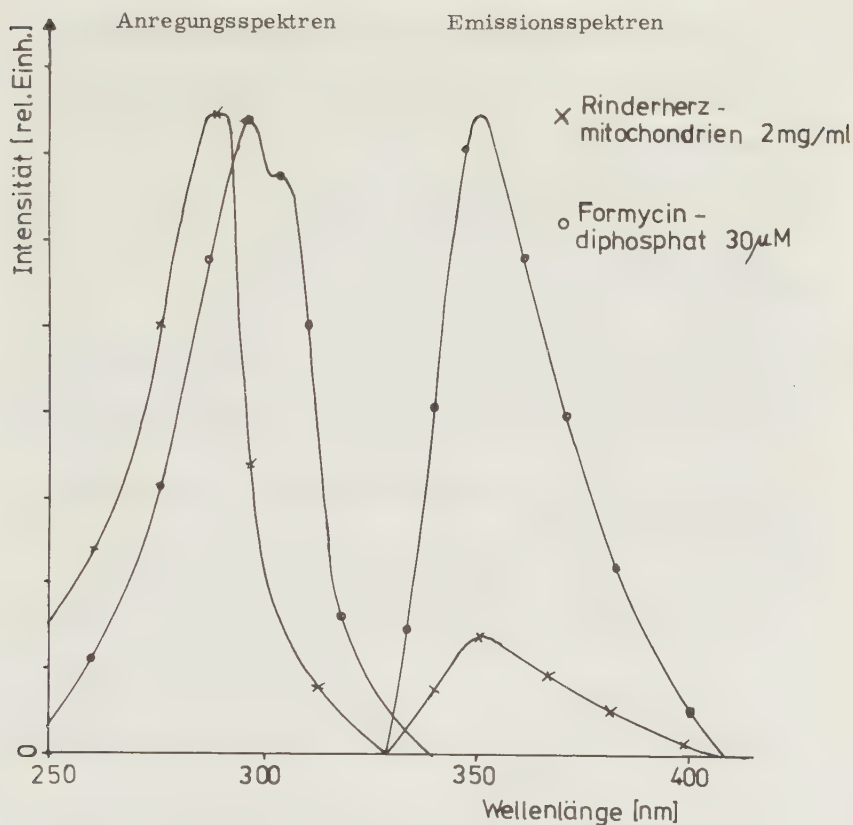


Bild 3 Vergleich der Anregungsspektren und der Emissionsspektren der Rinderherzmitochondrien und des FDP. Bei den Emissionsspektren ist die Anregungswellenlänge 295 nm und bei den Anregungsspektren wird die Emission bei 350 nm gemessen.

Der günstigste Anregungsbereich liegt bei 305 bis 310 nm, da dort das Tryptophan nur noch wenig absorbiert, FDP jedoch noch fast maximal. Bei allen Messungen wird aber die Tryptophanfluoreszenz zu berücksichtigen sein.

Gelingt es, die Fluoreszenz der FDP-Moleküle zu messen, die an den Carrier gebunden sind, so können sich die Möglichkeiten zu folgenden Aussagen eröffnen:

1. Aus der Messung der Bindung kann die Bindungskonstante des FDP und durch Bindungskompetition zwischen ADP und FDP auch die Bindungskonstante des ADP bestimmt werden. Ebenso kann auch die Kinetik der FDP-Bindung gemessen werden. Die Zeitauflösung wird hauptsächlich von der Mischbarkeit der Mitochondrienlösung abhängen.
2. Die Fluoreszenzabklingzeit eines Moleküls hängt auch von der chemischen Struktur der näheren Umgebung ab, so daß hieraus Aussagen über den Carrier gemacht werden können.
3. Die Polarisierung der Fluoreszenz ist ein Maß für die Beweglichkeit der Moleküle. Durch Messung der Abklingzeit der Polarisation kann die Rotationsgeschwindigkeit bestimmt werden. Damit läßt sich auf die Beweglichkeit der Bindungsstelle schließen.

Um die Möglichkeiten voll zu nutzen, sind zwei grundsätzlich verschiedene Meßapparaturen notwendig:

1. Die Fluoreszenz wird von einer konstanten Lichtquelle angeregt und es werden mit möglichst hoher Empfindlichkeit Änderungen der Intensität und Polarisierung gemessen, die durch Änderung der Zusammensetzung der Probe hervorgerufen sind.
2. Die Fluoreszenz wird durch einen kurzen Blitz angeregt, und es wird die Abklingzeit der Intensität und Polarisierung einer Probe gemessen.

2. Beschreibung der Messapparaturen

2.1 Messung von Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden mit dem handelsüblichen Fluoreszenzspektrographen HITACHI - PERKIN ELMER MPF 2A gemessen. In dieser Apparatur wird das Licht einer Xenonhochdrucklampe (Osram XBO 150 W) nach Passieren eines Gittermonochromators in eine Küvette mit der fluoreszierenden Substanz fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird im rechten Winkel zur Anregungsrichtung beobachtet. Es durchläuft einen Monochromator und fällt dann auf einen Photomultiplier, dessen Ausgangssignal verstärkt und auf einem Schreiber ausgegeben wird.

Intensitätsschwankungen der Xenonlampe werden automatisch kompensiert. Dazu fällt ein Teil des Lampenlichtes direkt auf einen Photomultiplier. Dessen Ausgangssignal regelt die Verstärkung des ersten Photomultiplier so, daß der Schreiberausschlag bei Änderungen der Lampenintensität konstant bleibt.

Beide Monochromatoren besitzen einen Vortrieb, so daß leicht Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen werden können.

2.2 Messung der Fluoreszenzpolarisation

Für die Messung der Fluoreszenzpolarisation gibt es verschiedene Methoden. In jedem Fall wird die Fluoreszenz durch Licht angeregt, das relativ zu der aus Einfall- und Beobachtungsrichtung gebildeten Ebene senkrecht polarisiert ist. Wird dann die Fluoreszenzintensität $I_{\uparrow}$ senkrecht und $I_{\rightarrow}$ parallel zu dieser Ebene gemessen, so versteht man unter der Fluoreszenzpolarisation den Ausdruck:

$$P = \frac{I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + I_{\rightarrow}} \quad (1)$$

Bei polarisierter Anregung liegt P im Bereich $-\frac{1}{3} \leq P \leq \frac{1}{2}$. Es ist naheliegend, im Emissionsstrahlengang ein Polarisationsfilter abwechselnd parallel und senkrecht zur Anregungspolarisationsrichtung zu orientieren und die dazugehörigen Intensitäten $I_{\uparrow}$ und $I_{\rightarrow}$ zu messen. Dabei ist aber zu beachten, daß die Optik nach dem Polarisationsfilter eine verschiedene Durchlässigkeit für Licht unterschiedlicher Polarisationsrichtung haben kann. Dies ist mit Sicherheit der Fall, wenn im Strahlengang ein Gittermonochromator folgt. Die Eigenpolarisation der Meßanordnung läßt sich aber leicht bestimmen. Hat die Fluoreszenzpolarisation der Probe den Wert $P = 0$, so ergeben die jetzt gemessenen Intensitätswerte $I_{\uparrow}^0$ und $I_{\rightarrow}^0$ den Eigenpolarisationsgrad $\alpha = I_{\uparrow}^0 / I_{\rightarrow}^0$ der Apparatur. Die Polarisation einer anderen Probe ist dann gegeben durch:

$$P = \frac{I_{\uparrow} - \alpha I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + \alpha I_{\rightarrow}} \quad (2)$$

Ein Problem ist es, Substanzen zu finden, deren Fluoreszenzpolarisation den Wert Null hat. Geeignet sind kleine fluoreszierende Moleküle in Lösungsmitteln mit kleinerer Viskosität wie etwa Anthracenderivate in Äthanol. Es ist auch vorgeschlagen worden /4/, an Stelle der Lösung einen Streifen Pergamentpapier in die Küvette zu stellen, der das Anregungslicht vollkommen depolarisiert. Auf diese Weise können sich aber leicht systematische Fehler einschleichen, insbesondere bei Messungen im UV-Bereich. Diese Schwierigkeiten können vermieden werden, wenn man die Fluoreszenz im rechten Winkel zur Einfallrichtung beobachtet. Wird jetzt das Anregungslicht parallel zur Ebene aus Einfall- und Beobachtungsrichtung polarisiert, ist das Fluoreszenzlicht aus Symmetriegründen unpolarisiert.

Die Beobachtung im rechten Winkel zur Anregung hat auch noch einen weiteren Vorteil. Gittermonochromatoren lassen nicht nur Licht des eingestellten Wellenlängenbereichs durch, sondern es wird auch ein Teil des eintretenden Lichtes an den reflektierenden Oberflächen des Monochromators diffus gestreut. Dies ergibt einen Streulichtanteil im austretenden Licht, der bei den üblichen Monochromatoren etwa 0,1 bis 0,5 % beträgt. Das Anregungslicht enthält damit auch schon Licht der Fluoreszenzlichtwellenlänge, was durch Streuung in der Lösung, insbesondere bei schwach fluoreszierenden Substanzen, einen störenden Untergrund bildet. Ebenso wird auch das Anregungslicht selbst an der Probe gestreut und gelangt durch Streuung im Emissionsmonochromator in den Photomultiplier. Dieser zweite Streulichtanteil läßt sich im allgemeinen durch Absorptionskantenfilter unterdrücken, die nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlassen. Für den Anregungslichtweg gibt es aber vor allem im UV nur selten passende Filter, die nur Strahlung unterhalb der Fluoreszenzlichtwellenlänge durchlassen. Hier muß man ausnutzen, daß das Streulicht immer stark polarisiert ist. Wird die Fluoreszenz relativ zur Ebene aus Einfall- und Beobachtungsrichtung parallel polarisiert angeregt, so ist bei Beobachtung im rechten Winkel zur Einfallsrichtung dort der Anteil des Streulichtes minimal.

Die Beobachtung im rechten Winkel zur Strahlrichtung hat allerdings den Nachteil, daß man sich auf Lösungen kleiner Extinktion beschränken muß, da bei hohen Extinktionen die Fluoreszenzintensität nicht mehr proportional zur Konzentration ist. Für Polarisationsmessungen bedeutet dies jedoch keine zusätzliche Einschränkung, da nur bei großen Konzentrationen eine Depolarisation durch Fluoreszenzübertragung zwischen den einzelnen Molekülen und damit ein systematischer Fehler zu erwarten ist.

Bei praktischen Polarisationsmessungen ist der ständig notwendige Wechsel der Richtungen der Polarisationsfilter etwas umständlich. Von Dehler und Dörr /4/ stammt eine elegante Meßmethode, die dies vermeidet und bei der auch die Eigenpolarisation der Monochromatoren keinen Einfluß hat.

Die Fluoreszenz wird senkrecht polarisiert angeregt, und das Fluoreszenzlicht durchläuft dann einen sich um die Beobachtungsrichtung mit der Kreisfrequenz ω drehenden Analysator und danach einen im Winkel von $\beta = 45^\circ$ gegen die Richtung von $I_\uparrow$ fest orientierten Analysator (Bild 4).

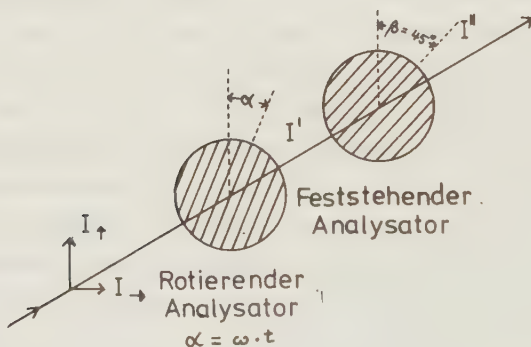


Bild 4 Strahlengang zwischen Kuvette und Monochromator

Die Polarisation der Fluoreszenz ist wieder durch die Intensitäten $I_\uparrow$ und $I_\rightarrow$ bestimmt. Nach dem rotierenden Analysator hat das Licht die Intensität

$$I' = I_\uparrow \cos^2 \alpha + I_\rightarrow \sin^2 \alpha = \frac{1}{2} (I_\uparrow + I_\rightarrow) + \frac{1}{2} (I_\uparrow - I_\rightarrow) \cos 2\omega t \quad (3)$$

und nach dem feststehenden Analysator die Intensität

$$\begin{aligned}
 I'' &= I' \cos^2(\alpha - 45^\circ) = \frac{1}{2} I' (1 + \sin 2 \omega t) \\
 &= \frac{1}{4} (I_{\uparrow} + I_{\rightarrow}) + \frac{\sqrt{2}}{4} \sqrt{I_{\uparrow}^2 + I_{\rightarrow}^2} \sin(2 \omega t + \varphi) \\
 &\quad + \frac{1}{8} (I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}) \sin 4 \omega t
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

$$\text{dabei ist} \quad \varphi = \arctan \frac{I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + I_{\rightarrow}}$$

$$\text{oder} \quad P = \tan \varphi \tag{5}$$

Der Anteil mit der Kreisfrequenz 2ω hat eine Phasenverschiebung, die direkt von der Polarisation abhängig ist.

Da den Emissionsmonochromator immer Licht der gleichen Polarisationsrichtung durchläuft, ist der Phasenwinkel von der Eigenpolarisation der Monochromatoren unabhängig.

Es wurde eine Meßelektronik gebaut, die eine dem Phasenwinkel proportionale Gleichspannung ausgab. Die Polarisation läßt sich mit einem Fehler von $\Delta P = 0,01$ messen. Die Meßanordnung ist besonders geeignet für die Aufnahme von Polarisationspektren, und es wurden mit ihr die ersten Bindungsmessungen von fluoreszierenden Molekülen an Enzymen durchgeführt. Diese Apparatur war anfänglich als Einsatz für das HITACHI - PERKIN ELMER Gerät gedacht. Es zeigte sich aber bald, daß dort die Empfindlichkeit nicht ausreichte. Es wurde deswegen eine neue Apparatur gebaut.

Als Lichtquelle diente hier eine Xenonhochdrucklampe (Osram XBO 450 W) mit einer leistungsfähigeren Fokussierung des Lichtes als im HITACHI. Als Anregungsmonochromator wurde ein spezieller UV-Gittermonochromator von Bausch & Lomb benutzt (Typ 338675, Blaze - Wellenlänge 250 nm). Das Anregungslicht wird durch Quarzlinen in die Küvette

fokussiert, und dabei durch ein Glan - Prisma polarisiert. Glan - Prismen haben zwar den Nachteil, daß die Strahlen nur schwach divergent sein dürfen, sie haben jedoch im UV-Bereich (200 bis 400 nm) eine größere Durchlässigkeit und Polarisationsgrad als Polarisationsfolien. Die Küvette kann im Bereich 0° - 70° C thermostatiert werden. Das Fluoreszenzlicht wird im rechten Winkel zur Anregung durch eine Quarzlinse gesammelt und auf den Eintrittsspalt eines zweiten Monochromators (Bausch & Lomb 33-86-45) abgebildet. Im Strahlengang befinden sich der rotierende und der fest orientierte Analysator. Der Austrittsspalt des zweiten Monochromators wird wieder durch eine Quarzlinse auf die Photokathode eines Photomultipliers abgebildet (EMI 9803). Sollte die Empfindlichkeit nicht ausreichen, können beide Monochromatoren aus dem Strahlengang entfernt und durch Absorptions- und Interferenzfilter ersetzt werden. Ebenso können mit dieser Apparatur die Abklingzeitmessungen durchgeführt werden. Dazu wird die Xenonlampe durch eine Blitzlampe ersetzt und der rotierende Analysator entfernt. Für Abklingzeitmessungen ist es auch notwendig, die Intensität des Anregungslichtes ändern zu können, ohne dabei etwa die Breite der Ein- oder Austrittsspalte der Monochromatoren zu variieren, deswegen befindet sich im Anregungsstrahlengang eine Irisblende.

Da die Abklingzeitmessungen gewöhnlich lange Zeit dauerten, wurde außerdem später noch ein einfacheres Gerät gebaut, damit parallel auch Polarisationsmessungen möglich waren. Hier wurde zur Anregung wieder die 450 W Xenonlampe und ein Bausch & Lomb Gittermonochromator benutzt. Durch eine auch im UV brauchbare Polarisationsfolie (Fa. Käsemann, Oberaudorf) wurde das Anregungslicht polarisiert. Zwei Quarzstäbe liegen im rechten Winkel zur Anregung an den beiden Seitenflächen der Küvette an und leiten das Fluoreszenzlicht zu zwei Photomultipliern. Zwischen Quarz-

stäben und Photomultipliern befinden sich Polarisationsfolien und Absorptionsfilter zur Unterdrückung des Anregungslichtes. Eine Polarisationsfolie ist parallel und die andere senkrecht zur Richtung des Anregungspolarisators orientiert, so daß gleichzeitig $I_{\uparrow}$ und $I_{\rightarrow}$ gemessen wird. Durch die hohe Intensität des Anregungslichtes, die Aufnahme der Fluoreszenz mit hoher Apertur und das Fehlen von Monochromatoren im Fluoreszenzlichtweg wird eine hohe Empfindlichkeit erreicht, die für alle Messungen ausreichend war. Die Signale $I_{\uparrow}$ und $I_{\rightarrow}$ der beiden Photomultiplier werden verstärkt und es kann wahlweise $I_{\uparrow}$, $I_{\rightarrow}$, $I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}$, $(I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}) / (I_{\uparrow} + I_{\rightarrow})$ auf einem Schreiber ausgegeben werden. Zusätzlich ist es möglich von $I_{\uparrow}$ und $I_{\rightarrow}$ ein konstantes Signal abzuziehen. Mit dieser Anordnung kann die Polarisation mit einem Fehler von $\Delta P = 0,01$ gemessen werden.

2.3 Messung von Fluoreszenzabklingzeiten

2.3.1. Auswahl der Meßmethode

Zur Messung von Fluoreszenzabklingzeiten im Bereich 10^{-9} - 10^{-7} s sind gegenwärtig drei Methoden üblich.

1. Phasenfluorometer

Die Probe wird durch sinusförmig modulierte Licht ($f \approx 1 - 20$ MHz) angeregt. Die Fluoreszenzintensität ändert sich mit gleicher Frequenz infolge der endlichen Abklingzeit aber mit einer Phasenverschiebung φ und einem veränderten Modulationsgrad. Ist der Abklingvorgang rein exponentiell, so besteht zwischen Frequenz f , Phasenwinkel φ und der Abklingzeit τ die Beziehung /5/.

$$\operatorname{tg} \varphi = 2 \pi f \cdot \tau \quad (6)$$

Ist der Abklingvorgang nicht mehr rein exponentiell, so ist eine Auswertung nur in Sonderfällen gut möglich. Es ist dann notwendig, die Frequenz über einen möglichst weiten Bereich zu ändern, was technisch nicht leicht durchführbar ist.

2. Sampling - Multiscaling

Die Fluoreszenz wird durch einen kurzen Blitz mit möglichst hoher Folgefrequenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht fällt auf einen Photomultiplier, dessen Impulse mit einem Sampling-Oszillographen gemessen werden. Auf dem Oszillographen ist der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzlichtes sichtbar. Die Empfindlichkeit kann gesteigert werden, wenn entweder durch ein einfaches RC-Glied oder besser durch einen Analog zu Digital Konverter mit nachgeschalteten Vielkanalanalysator über eine große Zahl von Blitzen gemittelt wird. Der technische Aufwand ist dann jedoch schon recht groß. Ein Nachteil der Methode ist es, daß bei Messung von kurzen Abklingzeiten in der Auswertung die endliche Blitzbreite und die Antwortfunktion des Photomultipliers auf einen δ -Impuls berücksichtigt werden muß.

3. Single photon counting (Delayed Coincidence)

Diese Meßmethode wurde von Bollinger und Thomas /6/ und von Koechlin /7/ entwickelt. Die Fluoreszenz wird wieder durch einen Blitz kurzer Dauer und möglichst hoher Folgefrequenz angeregt. Ein Teil des Blitzlichtes fällt direkt auf einen Photomultiplier und erzeugt einen Impuls, der den Zeitanfang bestimmt. Das Fluoreszenzlicht fällt auf einen zweiten Photomultiplier, dabei muß die Intensität so gering sein, daß im Mittel pro Blitz weniger als ein Photon registriert wird. Die Zeitdifferenz zwischen Blitz und Eintreffen des ersten Photons des Fluoreszenzlichtes wird mit einem Time-To-Pulse-Height-Converter in zur Zeit-

differenz proportionale Impulse umgewandelt, die in einem Pulshöhenvielkanalanalysator gespeichert werden. Es werden solche Zeitdifferenzen besonders häufig gemessen, denen in der Fluoreszenzabklingkurve hohe Intensitäten entsprechen. Mit der Zeit baut sich im Speicher des Vielkanalanalysators ein Bild der Fluoreszenzabklingkurve auf. Diese Methode ist allen anderen in der Empfindlichkeit überlegen, da nur einzelne Photonen registriert werden müssen. Da Zeitdifferenzen zwischen zwei Photomultiplierimpulsen gemessen werden, geht die Ansprechzeit der Photomultiplier in die Messung nicht ein, sondern nur die wesentlich kleinere Laufzeitdifferenz der Elektronen in den Photomultipliern. Bei der Auswertung muß hauptsächlich nur die endliche Breite des Blitzes berücksichtigt werden. Die Auswertung von nichtexponentiellen Abklingvorgängen oder Abklingvorgängen, die durch mehrere Exponentialfunktionen bestimmt sind, ist im Prinzip möglich, wenn sie auch einen erheblichen Rechenaufwand benötigt.

Da die zu untersuchenden Substanzen nur schwach fluoreszieren und eine kleine Abklingzeit haben, wurde diese Methode gewählt.

2.3.2. Apparatur zur Messung von Fluoreszenzabklingzeiten

2.3.2.1 Grundsätzlicher optischer Aufbau

Ein Teil des optischen Aufbaus ist mit der Apparatur zur Messung der Fluoreszenzpolarisation identisch und schon beschrieben worden. Die grundsätzliche Anordnung ist im Bild 5 skizziert. Als Lichtquelle dient jetzt eine Blitzlampe. Ein Teil des Blitzlichtes fällt über einen Lichtleiter direkt auf einen Photomultiplier (RCA 8575). Der Hauptteil der Strahlung der Blitzlampe wird durch eine Quarzlinse auf den Eintrittsspalt eines Gittermonochromators fokussiert (Bausch & Lomb 33-86-75). Die monochromatische

Strahlung kann mit einem Glan - Prisma polarisiert werden und fällt dann in die Küvette mit der fluoreszierenden Lösung. Das Fluoreszenzlicht wird mit einer Quarzlinse auf dem Eintrittsspalt eines zweiten Monochromators abgebildet (Bausch & Lomb 33-86-45). Zum Nachweis der Photonen des Fluoreszenzlichtes wird jetzt der Photomultiplier RCA 8850 benutzt, der besonders zum Zählen von einzelnen Photonen entwickelt wurde.

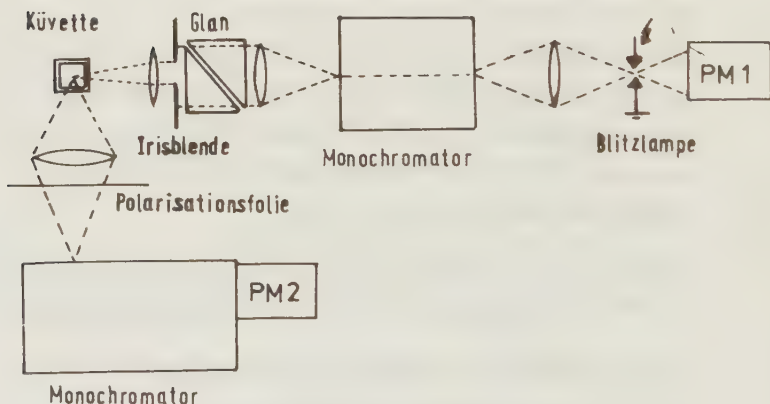


Bild 5 Grundsätzlicher optischer Aufbau der Apparatur
zur Messung von Fluoreszenzabklingzeiten

Einzelne Teile der Apparatur müssen eingehender beschrieben werden.

2.3.2.2. Blitzlampe

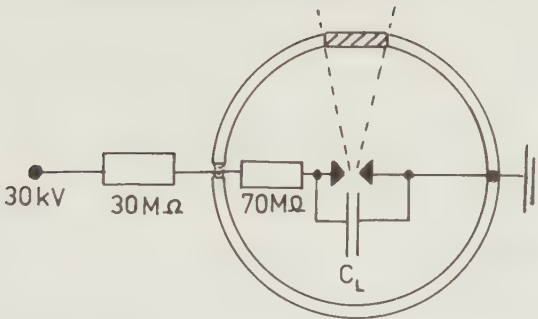


Bild 6 Prinzipschaltbild der Blitzlampe

Über einen Hochlastwiderstand ($30 \text{ M}\Omega$) und einen Kohleschichtwiderstand ($70 \text{ M}\Omega$) im Innern der Lampe wird die Streukapazität einer Wolframspitze gegenüber einer zweiten geerdeten Wolframspitze und dem geerdeten Lampenmantel aufgeladen. Ist die Zündspannung erreicht, entlädt sich die Kapazität durch einen kurzen Blitz in etwa $2 - 3 \text{ ns}$, und dieser Vorgang wiederholt sich laufend. Da der Blitz eine möglichst kurze Dauer haben sollte, müssen die Kapazitäten und Induktivitäten des Entladungskreises minimalisiert werden. Dies wird dadurch erreicht, daß die 5 mm lange Wolframspitze direkt an den $70 \text{ M}\Omega$ Widerstand gelötet wird. Eine geringe Kapazität bedeutet aber auch eine geringe Intensität der einzelnen Blitze, da angenähert gilt

$$\text{Intensität} \sim C_L \cdot U_Z^2$$

Die Zündspannung ist aber dem Gasdruck proportional. Zur Steigerung der Intensität wird deshalb die Lampe mit einem

N_2 , H_2 , He-Gemisch (90 : 5 : 5) unter hohem Druck (30 - 40 at) gefüllt. Das Spektrum der Lampe ist ein breites Kontinuum von etwa 260 nm bis 500 nm mit einigen N_2 -Linien. Der Wasserstoff vermindert die Korrosion der Elektroden, Helium wirkt als Löschgas und verringert etwas die Halbwertsbreite. Richtig justiert arbeitet die Lampe bis zu 10 h bei einer Frequenz von 20 kHz ohne meßbare Intensitätsänderung.

2.3.2.3. Meßelektronik

Die Elektronik besteht ausschließlich aus Bauteilen der Firma ORTEC /8/. Die Messung beruht auf der fortlaufenden Messung der Zeitdifferenz zwischen Blitz und Eintreffen des ersten Photons des Fluoreszenzlichtes.

Zur Messung des Blitzzeitpunktes fällt ein Teil des Blitzes auf den Photomultiplier RCA 8575. In der Photomultiplierbasis ist ein Verstärker und ein Diskriminator eingebaut, die das Startsignal für den Time-to-Pulse-Height-Converter liefern, wenn der Blitz 20 % des Maximalwertes erreicht. Die Photonen des Fluoreszenzlichtes fallen auf den Photomultiplier RCA 8850. Das Photomultipliersignal wird verstärkt und liefert mit einem Diskriminator das Stoppsignal für den Time-to-Pulse-Height-Converter (TPHC). Das Ausgangssignal des TPHC ist zur Zeitdifferenz Blitz - Erstes Photon proportional. Im nachgeschalteten Verstärker wird von diesem Signal zuerst ein konstantes einstellbares Signal abgezogen und die Differenz der beiden Signale wird dann weiter verstärkt und in einem Vielkanalanalysator der Größe nach sortiert und gespeichert. Der Inhalt des Speichers kann mit einem X - Y Schreiber und mit einem Teletype ausgegeben werden. Bild 7 zeigt den schematischen Aufbau der Elektronik. Das Bild 8 ist ein Photo der gesamten Appa-

ratur. Im linken Teil sieht man die Blitzlampe mit dem Anregungsmonochromator, die Küvettenhalterung mit Thermostaten und den Emissionsmonochromator. Rechts davon befindet sich die Meßelektronik mit dem Vielkanalanalysator.

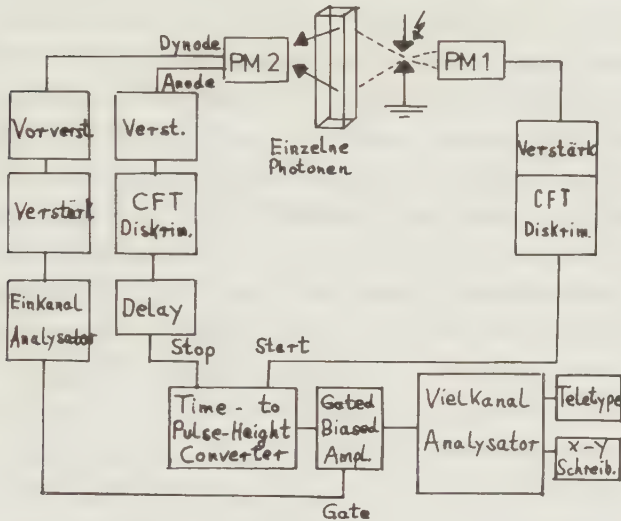


Bild 7 Schematischer Aufbau der Elektronik

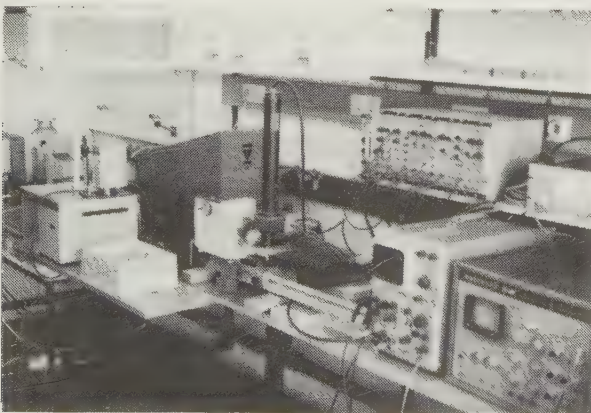


Bild 8 Photo der Apparatur zur Messung der Fluoreszenzabklingzeiten

Die Genauigkeit der Messung hängt hauptsächlich von der Genauigkeit der Messung der Zeitdifferenz zwischen Blitz und erstem Photon ab. Die Schwierigkeit liegt darin, daß das vom Photon auf der Photokathode emittierte Elektron an der ersten Dynode eine statistisch schwankende Zahl von Sekundärelektronen auslöst, und das Anodensignal entsprechend schwankt. Dies ist zwar bei der RCA 8850 durch eine hohe Kathoden-Dynodenspannung (600 - 1000 V) und eine Gallium-Phosphid Dynode so weit optimiert, daß im Durchschnitt 30 bis 40 Elektronen emittiert werden (normal ca. 6), jedoch ist eine Verbesserung der Genauigkeit durch Constant-Fraction-Timing-Trigger möglich. In den üblichen Triggern wird das Signal ausgelöst, wenn das Eingangssignal ein einstellbares Niveau überschreitet. Schwanken die Signale in der Höhe, wird sich entsprechend der Triggerzeitpunkt relativ zum Impulsmaximum verschieben. Ein Constant-Fraction-Timing Trigger gibt im Gegensatz dazu sein Signal, wenn das Eingangssignal einen einstellbaren Teil der Maximalhöhe erreicht. Da bei Photomultipliern die Anstiegszeit nicht von der Signalgröße abhängt, ist bei dieser Art der Triggerung auch der Triggerzeitpunkt von der Signalgröße unabhängig. Zur Steigerung der Genauigkeit der Zeitdifferenzmessung werden die Ausgangssignale beider Photomultiplier mit Constant - Fraction-Timing-Triggern getriggert. Dies ist insbesondere bei Messung kurzer Abklingzeiten notwendig. Erreicht die beiden Photomultiplier gleichzeitig ein Lichtsignal, so wird dies von der Apparatur mit einer Unschärfe von 380 ps gemessen /9/. Ein Teil dieser Ungenauigkeit hat seine Ursache in der Laufzeitdifferenz der Elektronen in den Photomultipliern. Durch diese Zeitunschärfe sind die gemessenen Intensitätsverläufe von Blitz und Fluoreszenz breiter als die real stattfindenden. Wie noch gezeigt werden wird, ist hierdurch die Genauigkeit der Messung nicht beeinträchtigt.

2.3.2.4. Ein systematischer Fehler der Meßmethode und seine Korrektur

Da immer nur die Zeit bis zum ersten Photon des Fluoreszenzlichtes gemessen wird und alle anderen danach folgenden Photonen ignoriert werden, wird die Meßkurve systematisch verzerrt. Diese Verzerrung ist umso größer, je größer die Wahrscheinlichkeit ist, daß pro Blitz ein Photon registriert wird. Der Grad der Verzerrung ist ungefähr proportional der Sammelrate, das ist das Verhältnis aus Anzahl registrierter Photonen zur Anzahl der Blitze. Für genaue Messungen müßte die Sammelrate kleiner als 0,01 gehalten werden, was aber die Meßdauer unzulässig verlängert. Die Kurvenverzerrung kann aber eliminiert werden, entweder elektronisch oder durch eine nachträgliche mathematische Korrektur.

2.3.2.4.1 Elektronische Korrektur

Es gibt verschiedene Schaltungsmöglichkeiten, die alle im Prinzip das Gleiche bewirken. Erreicht nach dem ersten Photon innerhalb einer einstellbaren Zeit noch ein zweites Photon den Photomultiplier, wird das erste Photon nicht registriert. In der Apparatur ist das in dem sogenannten linearen Kanal verwirklicht. Die Spannungsänderung an der 10. Dynode des Photomultiplier RCA 8850 beim Durchlauf einer Elektronenwolke wird vorverstärkt und durch einen differenzierenden Verstärker weiter verstärkt. Ein einzelnes Photon ergibt ein Signal, das in dem Rahmen schwankt, wie es durch die statistisch schwankende Zahl der Sekundärelektronen an der ersten Dynode gegeben ist. Folgt aber in einer einstellbaren Zeit ($0,5 - 2,0 \mu s$) ein zweites Photon, so ist der Ausgangsimpuls des Verstärkers doppelt so groß. Durch einen Diskriminator, der nur solche Impulse durchläßt, die zwischen zwei einstellbaren Niveaus liegen, lassen sich die Impulse aussortieren, die zu einzelnen Photonen gehören. Durch diese Einrichtung ist

bis zu einer Sammelrate von 0,2 die Verzerrung der Meßkurven kleiner als der statistische Fehler /10, 11/.

2.3.2.4.2. Mathematische Korrektur

Weniger aufwendig ist eine nachträgliche mathematische Korrektur (Coates /12, 13/). Experimentell werden nach N_{Bl} Blitzen N_i Counts im i -ten Kanal gespeichert sein, also im gesamten Speicher mit seinen 256 Kanälen $N = \sum_{i=1}^{256} N_i$. Gesucht wird die Wahrscheinlichkeit S_i für das Eintreffen eines einzelnen Photons auf dem Photomultiplier in dem Zeitintervall, das dem i -ten Kanal entspricht. Davon ist zu unterscheiden die Wahrscheinlichkeit, daß nach dem Blitz ein Photon im i -ten Kanal registriert wird, da ein Photon dort nur dann registriert werden kann, wenn kein anderes in den Kanälen vorher registriert wurde. Der Inhalt des i -ten Kanals ist deshalb gegeben durch

$$N_i = N \cdot S_i \cdot \prod_{j=1}^{i-1} (1 - S_j) \quad (7)$$

Das kann umgeformt werden in:

$$S_i = N_i / (N - \sum_{j=1}^{i-1} N_j) \quad (8)$$

Im i -ten Kanal würden also ohne gegenseitige Beeinflussung der Registrierung der einzelnen Photonen nach N_{Bl} -Blitzen

$$N_i^{korr} = N_{Bl} \cdot N_i / (N - \sum_{j=1}^{i-1} N_j) \quad (9)$$

Photonen gezählt werden. Eine Fehlerbetrachtung zeigt, daß bis zu einer Sammelrate von 0,2 nach der Korrektur die Verzerrung der Meßkurven kleiner ist als der statistische Fehler.

Bei den Messungen wurden beide Korrekturmöglichkeiten benutzt. Der Vorteil der elektronischen Korrektur ist, daß sie von Schwankungen der Sammelrate unabhängig ist - im Gegensatz zur mathematischen Korrektur. Dies ist aber bei der Stabilität der Blitzlampe kein wesentlicher Vorteil, so daß bei den meisten Messungen die mathematische Korrektur vorgezogen wurde.

Die Güte beider Korrekturmöglichkeiten und gleichzeitig auch die Linearität der Zeitdifferenz in die Kanalnummerumwandlung der Elektronik läßt sich testen, indem der Time-to-Pulse-Height-Converter mit einem Impulsgenerator gestartet wird und für das Stop-Signal die statistisch ankommenden Photonen des Tageslichts genommen werden. Bei sehr kleinen Sammelraten ist die Registrierung eines einzelnen Photons in allen Kanälen gleich wahrscheinlich, so daß auf dem Oszillographen des Vielkanalanalysators eine langsam ansteigende waagerechte Linie zu sehen ist. Dies bedeutet, daß in allen Kanälen im Rahmen des statistischen Fehlers gleichviel Counts gezählt werden. Je größer aber die Sammelrate wird, desto mehr fällt diese Linie zu größeren Zeiten hin (= höheren Kanalnummern) ab. Wird der lineare Kanal zur elektronischen Korrektur eingeschaltet oder werden die Kurven nachträglich mathematisch korrigiert, so zeigt sich bis zu einer Sammelrate von ca. 0,2 wieder eine waagerechte Linie.

2.3.2.5. Praktische Durchführung der Messungen

Zur Ermittlung der gesuchten Abklingkurve ist es notwendig, sowohl den zeitlichen Verlauf des Blitzes als auch der Fluoreszenz zu messen.

Zur Messung des Blitzes wurden Anregungs- und Emissionsmonochromator auf die Anregungswellenlänge eingestellt und in die Küvette eine stark streuende Lösung von Dextran gefüllt. Mit der Irisblende kann jetzt die Intensität des Anregungslichtes so eingestellt werden, daß die

Sammelrate etwa im Bereich 0,1 - 0,05 liegt. Der Blitz wird dann so lange gemessen, bis im Intensitätsmaximum etwa 10^5 Impulse gezählt wurden. Jetzt wird eine Küvette mit der fluoreszierenden Lösung in den Strahlengang gebracht und der Emissionsmonochromator auf die Fluoreszenzlichtwellenlänge eingestellt. Die Irisblende wird dann so weit geöffnet, bis die Sammelrate wieder im Bereich 0,1 - 0,05 liegt.

Es kann auch die Zeitabhängigkeit der Polarisierung gemessen werden. Dazu wird mit senkrecht polarisiertem Licht angeregt. Im Emissionsstrahlengang wird ein Polarisationsfilter parallel und dann senkrecht zur Anregungsrichtung orientiert, und es werden die dazugehörigen Fluoreszenzkurven gemessen.

Alle Meßkurven werden dann mit dem X-Y-Schreiber und auf Lochstreifen ausgegeben.

2.3.3. Auswertung der Messung von Fluoreszenzabklingfunktionen

2.3.3.1. Einfluß der Ansprechzeit der Meßapparatur

Die Auswertung der Meßkurven erfordert einen erheblichen Rechenaufwand. Wird die Fluoreszenz mit einem unendlich kurzen δ -Impuls angeregt, so klingt sie zeitlich mit einer Funktion $f(t)$ ab, die im einfachsten Fall eine reine Exponentialfunktion ist. Es sind aber auch Summen von Exponentialfunktionen und nicht rein exponentielle Funktionen möglich. Hat der Blitz $E(t)$ jedoch eine endliche Dauer, so ist der zeitliche Verlauf des Blitzes und der Fluoreszenz $F(t)$ durch das Faltungsintegral verbunden

$$F(t) = \int_0^t E(t-t') f(t') dt' \quad (10)$$

Da die in Frage kommenden Zeiten auch in der Größenordnung der Ansprechzeiten der Meßapparatur liegen, stimmen diese Blitz- und Fluoreszenzfunktionen $E(t)$ und $F(t)$ nicht mit denen durch eine Apparatur gemessenen Funktionen $E_m(t)$ und $F_m(t)$ überein. Da die Zeitmessung nur mit einer Genauigkeit von $\Delta t \approx 0,2 \text{ ns}$ möglich ist und auch die Laufzeitdifferenz der Elektronen innerhalb der Photomultiplier die gleiche Größenordnung hat, wird ein δ -Impuls als ein Impuls $A(t)$ von endlicher Dauer gemessen. $E(t)$ und $E_m(t)$, wie auch $F(t)$ und $F_m(t)$ sind deswegen auch durch das Faltungsintegral verbunden

$$E_m(t) = \int_0^t E(t-t') A(t') dt' \quad (11)$$

$$F_m(t) = \int_0^t F(t-t') A(t') dt' \quad (12)$$

Dann gilt wieder

$$F_m(t) = \int_0^t E_m(t-t') f(t') dt' \quad (13)$$

Zwischen den gemessenen Zeitfunktionen $E_m(t)$ und $F_m(t)$ besteht also der gleiche Zusammenhang wie zwischen den eigentlich physikalisch wichtigeren Funktionen $E(t)$ und $F(t)$.

2.3.3.2. Spektrale Korrektur der Meßkurven

Bis jetzt wurde vorausgesetzt, daß $A(t)$ von der Wellenlänge unabhängig ist. Dies ist jedoch eine Vernachlässigung, die bei manchen Messungen nicht gemacht werden kann (Heiss /14/, Wahl /15/).

Das von einem Photon auf der Kathode ausgelöste Elektron hat eine kinetische Anfangsenergie, die gegeben ist durch:

$$E = h\nu - W_A \quad (14)$$

(ν Frequenz des Photons, W_A Austrittsarbeit aus der Kathodenoberfläche)

Die vom Blitz ausgelösten Elektronen haben eine höhere Anfangsgeschwindigkeit, als die von der Fluoreszenz ausgelösten Elektronen, so daß die Fluoreszenzfunktion um eine Zeit ΔT nach größeren Zeiten hin verschoben wird. Diese Zeitverschiebung kann bei großen Unterschieden in der Anregungs- und Emissionswellenlänge 0,5 ns groß sein und wirkt sich dann besonders bei der Messung kurzer Abklingzeiten aus. Aus der Gleichung $E = h\nu - W_A$ lassen sich Näherungen für ΔT berechnen (Heiss /14/), und die Meßkurven können entsprechend korrigiert werden. Es zeigt sich jedoch, daß bei allen in der Arbeit vorkommenden Messungen diese Korrektur vernachlässigbar klein ist. Hauptsächlich wird nämlich bei zwei Wellenlängenpaaren gemessen:

1. Fluoreszenz des FDP - Anregung 310 nm, Emission 340 nm
Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge liegen so dicht beieinander, daß trotz der kurzen Abklingzeit des FDP die Zeitverschiebung vernachlässigbar ist.
2. Fluoreszenz des Anthracens - Anregung 310 nm, Emission 450 nm. Im ungünstigsten Fall errechnet sich eine Zeitverschiebung von 0,2 ns. Bei der Korrektur der Meßkurven um diese Zeit verändert sich die Abklingzeit von 6,8 ns auf 6,5 ns. Dies entspricht dem Fehler der Messung.

2.3.3.3. Mathematische Methoden zur Bestimmung der Fluoreszenzabklingfunktion $f(t)$

Von alleinigem physikalischen Interesse ist die Fluoreszenzabklingfunktion $f(t)$. Deren Bestimmung aus den Meßkurven $E_m(t)$ und $F_m(t)$ bereitet jedoch erhebliche mathematische Schwierigkeiten, da sie eine Lösung der 1. Volterraschen Integralgleichung bedeutet. Zur Lösung sind eine Reihe von Möglichkeiten vorgeschlagen worden:

1. Fouriertransformierung und Laplacetransformierung /16, 17/

In der Fouriertransformierung entstehen durch die in Meßkurven unvermeidbaren statistischen Fehler Oszillationen, die nur durch "Herausfiltern" einzelner Teile des Fourierspektrums etwas verkleinert werden können. Bei der Laplacetransformierung ist es zur Auswertung notwendig anzunehmen, daß $f(t)$ eine Summe oder Differenz von zwei Exponentialfunktionen ist.

2. Matrixinversion /18/

Das Faltungsintegral kann als Produkt eines Vektors mit einer Matrix aufgefaßt werden

$$F = E \cdot f \quad (15)$$

Die Fluoreszenzabklingfunktion ergibt sich dann als

$$f = E^{-1} \cdot F \quad (16)$$

Die Inversion der Matrix E ist jedoch nur sehr ungenau möglich, da die Determinante von E sehr klein gegen die Norm der Matrix ist.

Damit erzeugen die in den Meßkurven vorhandenen Fehler Oszillationen in $f(t)$, die durch zusätzliche Annahmen über $f(t)$ nur schwer vermindert werden können.

Weniger unter dem Einfluß der Meßfehler leiden

3. Methode der Momente /19, 20, 21/

4. Anpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate /22, 23/ - Gradientenverfahren /24/

Da diese beiden Methoden parallel benutzt wurden, werden sie genauer besprochen.

2.3.3.4. Methode der Momente

Die Methode der Momente wurde hauptsächlich von Isenberg entwickelt (Isenberg, Dyson /19/, Isenberg, Dyson, Hanson /20/, Isenberg /21/, Ist $f(t)$ eine Summe von Exponentialfunktionen, so besteht zwischen den Momenten

$$m_k = \int_0^{\infty} t^k E(t) dt \quad (17)$$

des Blitzes und den Momenten

$$k = 0, 1, 2, \dots$$

$$\mu_k = \int_0^{\infty} t^k F(t) dt \quad (18)$$

der Fluoreszenz der Zusammenhang

$$\mu_k = k! \sum_{s=1}^{k+1} G_s \cdot m_{k+1-s} / (k+1-s) \quad (19)$$

Dabei ist

$$G_s = \sum_{n=1}^N \alpha_n \cdot \tau_n^s \quad \text{wenn} \quad f(t) = \sum_{n=1}^N \alpha_n \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (20)$$

α_n sind die Amplituden und τ_n die Abklingzeiten der Exponentialfunktionen. Sind die m_k und die μ_k bekannt, ergeben sich die G_s daraus durch ein einfaches lineares Gleichungssystem. Die Lösung des nichtlinearen Gleichungssystems

$$G_s = \sum_{n=1}^N \alpha_n \cdot \tau_n^s \quad s = 1, 2, 3, \dots \quad (21)$$

kann nach der Methode von Prony /42/ auf die Lösung eines Polynoms vom Grade n reduziert werden, aus der sich die Abklingzeiten als Wurzeln des Polynoms ergeben. Die Amplituden α_n können dann wieder durch ein lineares Gleichungssystem bestimmt werden.

Da $E(t)$ und $F(t)$ nur in einer gewissen Zeitspanne gemessen werden können, müssen die Momente durch

$$\tilde{m}_k = \int_0^{T_m} t^k E(t) dt \quad \tilde{\mu}_k = \int_0^{T_m} t^k F(t) dt \quad (22)$$

angenähert werden. Entsprechend sind die erhaltenen Abklingzeiten auch nur eine Näherung. Eine Verbesserung läßt sich erzielen, wenn die Meßkurven über die Zeitskala hinaus extrapoliert werden. Dabei wird für Zeiten größer als T_m die Fluoreszenzkurve aus den erhaltenen Amplituden und Abklingzeiten berechnet und damit eine Korrektur der Momente der Fluoreszenz bestimmt.

Jetzt lassen sich neue Abklingzeiten und Amplituden bestimmen und dieses Verfahren wird so lange wiederholt, bis sich die gefundenen Werte nicht mehr wesentlich ändern. (Eine Beschreibung der praktischen Durchführung des Verfahrens findet sich im Anhang.)

Ist die Annahme gerechtfertigt, daß $f(t)$ eine Summe aus zwei Exponentialfunktionen ist, arbeitet diese Methode recht zuverlässig. Wie Tests mit berechneten Blitz- und Fluoreszenzkurven zeigten, ist die Genauigkeit am größten, wenn die verschiedenen Komponenten mit gleichem Gewicht zu $f(t)$ beitragen. In diesem Fall ist der Fehler ca. 5 bis 10 % je nach Größe der Abklingzeiten. Die Fehler steigen an, wenn eine Komponente überwiegt.

Ist $f(t)$ eine Summe aus drei Exponentialfunktionen, arbeitet die Methode wenig zuverlässig. Sie ist dann allenfalls als Test dafür brauchbar, ob eine Abklingfunktion besser durch drei Exponentialfunktionen angepaßt wird.

Der Hauptvorteil der Methode der Momente liegt darin, daß sie mit Sicherheit Werte für die Abklingzeiten und Amplituden liefert, die mindestens in der richtigen Größenordnung liegen. Die Methode ist auch ein guter Test dafür, ob eine Anpassung mit Exponentialfunktionen möglich ist. Ist dies nicht der Fall, oder sollen die von der Methode der Momente erhaltenen Werte verbessert oder auf ihre Genauigkeit überprüft werden, so eignet sich eine mathematisch weniger aufwendige Methode.

2.3.3.5. Anpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate

Für $f(t)$ wird eine bestimmte funktionale Form angenommen, etwa die Summe von Exponentialfunktionen, oder auch eine andere, die nach dem physikalischen Modell der Messung zu erwarten wäre. Im allgemeinen läßt sich $f(t)$ dann schreiben als

$$f(t) = \sum \alpha_i \cdot f(\tau_i, t) \quad (23)$$

Werden die nichtlinearen Parameter τ_i vorgegeben, so können aus den Normalgleichungen die linearen Parameter α_i berechnet werden, die für einen optimalen Fit notwendig sind. Aus den berechneten Werten läßt sich eine theoretische Fluoreszenzkurve ermitteln, die mit der experimentellen Kurve verglichen werden kann. Ist die Übereinstimmung nicht gut, werden die nichtlinearen Parameter variiert, bis sich eine gute Übereinstimmung ergibt. Ist dies für sinnvolle Parameter nicht möglich, so ist anzunehmen, daß das physikalische Modell nicht stimmt. Diese Methode ist

sehr zeitaufwendig, da allgemeine Methoden der nichtlinearen Anpassung, wie etwa Gradientenverfahren, äußerst unzuverlässig sind.

Beide besprochenen Rechenverfahren wurden parallel benutzt. Im allgemeinen wurde zuerst mit der Methode der Momente eine Anpassung gesucht und dann deren Güte mit Anpassungen nach der Methode der kleinsten Quadrate für leicht veränderte Abklingzeiten überprüft.

3. Theorie der Fluoreszenz

Um die Möglichkeiten zu finden, die Bindung eines fluoreszierenden Moleküls an einem großen Protein zu messen, ist es notwendig, auf die Theorie der Fluoreszenz einzugehen.

Der Energieinhalt eines Moleküls ist bestimmt durch die Elektronenkonfiguration, die Schwingungen der Kerne und die Rotation des gesamten Moleküls. Der Beitrag der Rotationsenergie ist relativ klein und kann hier vernachlässigt werden. Ändert sich die Elektronenkonfiguration durch Änderungen der Kernschwingungen nur wenig, kann die Gesamtwellenfunktion als Produkt eines Elektronenanteils und eines Kernanteils geschrieben werden.

$$\Psi = \Psi_e \cdot \Psi_n \quad (24)$$

Die Elektronenzustände sind nicht mehr einfach, sondern in durch die Kernschwingungszahl v_k bestimmte Zustände mit der Energie $W_i + w_k$ aufgespalten (W_i Energie des Elektronenzustandes, w_k Kernschwingungsenergie).

Bei Einstrahlung von Licht kann das Molekül in einen angeregten Elektronenzustand übergehen. Beim Übergang zwischen dem Grundzustand mit der Schwingungsenergie w_k und dem ersten angeregten Zustand mit der Schwingungsenergie w_l ist die Frequenz des absorbierten oder emittierten Lichtquants gegeben durch

$$h \nu_{kl} = W_l - W_0 + w_l - w_k \quad (25)$$

Die Übergangswahrscheinlichkeit ist im wesentlichen bestimmt durch das Quadrat des Matrixelementes

$$M_{0k \rightarrow 1l} = -e \int \Psi_0 \Psi_k \sum \vec{r}_i \Psi_l \Psi_e d\vec{r}_i \quad (26)$$

Die Integration ist hier über die Elektronen- und Kernkoordinaten zu erstrecken.

Bei Einstrahlung von Licht der Frequenz ν und der Energiedichte $\sigma(\nu)$ ist die Anregungswahrscheinlichkeit gegeben durch

$$n_{0k,1k} = \frac{8\pi^3}{3n^2 h^2} \left| M_{0k \rightarrow 1k} \right|^2 \sigma(\nu) \quad (27)$$

und die Wahrscheinlichkeit der spontanen Emission durch

$$n_{1k,0k} = \frac{64\pi^4 n \nu^3}{3h c_0^3} \left| M_{0k \rightarrow 1k} \right|^2 \quad (28)$$

(n Brechungsindex, c_0 Lichtgeschwindigkeit)

Dies sind die Wahrscheinlichkeiten für Übergänge zwischen zwei festen Werten der Schwingungsenergie im Grundzustand und im angeregten Zustand. Die Moleküle ändern aber innerhalb eines Elektronenzustandes ständig ihren Schwingungszustand. Die einzelnen Schwingungsterme haben dabei Besetzungswahrscheinlichkeiten g_0 (w_k) und g_1 (w_1), die im thermischen Gleichgewicht durch die Boltzmann-Statistik gegeben sind. Da außerdem durch die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel die Einzelübergänge in viele energetisch dicht benachbarte Übergänge aufgespalten sind, ist es sinnvoll, von den Momentquadraten der Einzelübergänge zu Momentquadratdichtefunktionen überzugehen. Die Gesamtheit aller zum Frequenzbereich ν bis $\nu + d\nu$ gehörenden Absorptions- oder Emissionsprozesse ergibt sich dann durch Integration über alle Kernschwingungsenergien, die die Bohrsche Frequenzbedingung erfüllen.

$$n_a(\nu) d\nu = \frac{8\pi^3}{3n^2h} \sigma(\nu) \int_{\omega=0}^{\infty} g_0(\omega) M_{0,1}^2(\omega, \omega_0 - \omega + \omega + h\nu) d\omega d\nu$$

$$n_e(\nu) d\nu = \frac{64\pi^4 h \nu^3}{3c^3} \int_{\omega=0}^{\infty} g_1(\omega) M_{1,0}^2(\omega_1 - \omega_0 + \omega - h\nu, \omega) d\omega d\nu$$

(29)

Durch diese beiden Beziehungen sind die molekularen Absorptions- und Emissionseigenschaften, die auf Strahlungsprozessen beruhen, festgelegt. Sie stehen deswegen auch mit durch Messung zugänglichen Größen in unmittelbarem Zusammenhang.

Die Absorptionseigenschaften eines Moleküls werden häufig durch den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten beschrieben. Fällt Strahlung auf eine Schicht der absorbierenden Moleküle mit der Fläche $A = 1 \text{ cm}^2$, der Dicke dx und der Konzentration C , so nimmt die Strahlungsdichte $\sigma(\nu)$ nach dem Beerschen Gesetz in der Strahlrichtung x ab gemäß

$$d\sigma(\nu) = \ln 10 \cdot \sigma(\nu) \cdot \epsilon(\nu) \cdot C \cdot dx \quad (30)$$

In dieser Schicht wird dann pro Sekunde die Energie absorbiert

$$dW = \frac{n}{c_0} \ln 10 \cdot \sigma(\nu) \cdot \epsilon(\nu) \cdot C \cdot dx \quad (31)$$

Wird die Konzentration in Mol / l angegeben und ist $N' = 6,02 \cdot 10^{20}$ die Zahl der Moleküle im Millimol, so ist diese absorbierte Energie gleich dem Produkt aus $h\nu$, der Zahl der in der Schicht enthaltenen Moleküle und der Anregungswahrscheinlichkeit.

$$dW = h\nu \cdot n_a(\nu) \cdot N' C dx \quad (32)$$

Damit ergibt sich dann

$$\begin{aligned} \varepsilon(\nu) &= \frac{h\nu N'}{\ln 10 \sigma(\nu) \cdot n \cdot c_0} n_a(\nu) \\ \varepsilon(\nu) &= \frac{8\pi^3 N' \nu}{3n \ln 10 \cdot c_0} \int_0^\infty g_0(\omega) M_{01}^2(\omega, \omega_0 - \omega_1 + \omega + h\nu) d\omega \quad (33) \end{aligned}$$

Da $n_e(\nu)$ alle Emissionseigenschaften beschreibt, ist das Integral

$$\int_0^\infty n_e(\nu) d\nu = n_e \quad (34)$$

die Gesamtheit aller Emissionsprozesse pro Sekunde, die mit der mittleren Lebensdauer τ_0 durch

$$n_e = \frac{1}{\tau_0}$$

verbunden sind. Zur Beschreibung des Fluoreszenzspektrums wird meistens das Quantenspektrum $f_Q(\nu)$ benutzt, das den Bruchteil der auf ein Einheitsintervall im Bereich der Frequenz entfallenden Quanten angibt.

$$f_Q(\nu) = \frac{n_e(\nu)}{n_e} = \frac{64\pi^4 h^3 \tau_0}{3c^3} \int_0^\infty g_1(\omega) M_{10}^2(\omega_1 - \omega_0 + \omega - h\nu, \omega) d\omega \quad (35)$$

Nur den wenigsten Übergängen, die nach der Bohrschen-Frequenzbedingung möglich sind, entsprechen auch Übergänge hoher Intensität, da entweder die Besetzungswahrscheinlichkeit g des Ausgangszustandes oder das Momentquadrat klein ist. Die Gründe dafür sind:

1. Im Grundzustand befindet sich die Verteilung der Kernschwingungen im thermischen Gleichgewicht, was bewirkt, daß bei Zimmertemperatur Übergänge nur vom Schwingungsterm niedrigster Energie ausgehen und das

Absorptionsspektrum nur von den Schwingungstermen des angeregten Zustands bestimmt ist.

Wird ein Molekül in einen höheren als den ersten angeregten Zustand überführt, geht es sehr schnell durch strahlungslose Übergänge in den ersten angeregten Zustand über. Dort ist im allgemeinen die mittlere Lebensdauer (10^{-7} - 10^{-9} s) groß genug, damit sich durch Stöße mit anderen Molekülen das thermische Gleichgewicht einstellt. Dies ist nur in Dämpfen unter geringem Druck nicht möglich. Die Emission erfolgt dann wieder vom Schwingungsterm niedrigster Energie, so daß das Emissionsspektrum nur von den Schwingungstermen des Grundzustandes bestimmt ist.

Absorptions- und Emissionsspektrum haben damit nur den $O \rightarrow O$ Übergang gemeinsam. Haben die Schwingterme des Grundzustands und des ersten angeregten Zustands gleiche Energie, ist das Emissionsspektrum gleich dem an der Frequenz des $O \rightarrow O$ Übergangs gespiegelten Absorptionsspektrum. Durch den Verlust von Kernschwingungsenergie nach der Anregung liegt das Emissionsspektrum damit stets bei längeren Wellen als das Absorptionsspektrum.

2. Beim raschen Elektronenübergang bleiben die trägen Kerne nach dem Franck - Condon Prinzip (Born-Oppenheimer) zunächst in Ruhe. Das Matrixelement läßt sich dann umformen in ein Produkt aus einem Matrixelement, das nur von den Elektronenkoordinaten abhängt und dem Überlappungsintegral der Kernwellenfunktionen.

$$M_{0k,1l} = -e \int \psi_0 \sum r_e \psi_1 d\tau_e \cdot \int \psi_k \psi_l d\tau_n \quad (37)$$

Ist der Kernabstand in beiden Elektronenzuständen gleich, wird der $O \rightarrow O$ Übergang besonders intensiv sein. Im üblichen Fall der Bindungslockerung wird dies jedoch der Übergang $O \rightarrow 1$ oder $O \rightarrow 2$ sein.

Das Lösungsmittel hat im allgemeinen einen sehr großen Einfluß auf die Form des Absorptions- und Emissionsspektrums. Durch die Wechselwirkung mit den Lösungsmittelmolekülen sind sehr oft die einzelnen Fluoreszenzübergänge nicht aufgelöst. Darüber hinaus verschiebt sich auch das Fluoreszenzspektrum meistens um so mehr zu längeren Wellen, je größer die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel ist. Haben der angeregte Zustand und der Grundzustand ein verschiedenes Dipolmoment oder eine verschiedene Polarisierbarkeit, so werden sich beide Zustände auch in der Solvation unterscheiden. Das Ausmaß der Solvation hängt natürlich auch von der Polarität des Lösungsmittels ab. Je größer die Änderung der Solvationshülle ist, desto mehr werden strahlungslose Übergänge begünstigt sein und die Quantenausbeute sinkt ab. Gleichzeitig rücken durch den Energieverlust bei der Umordnung der Lösungsmittelmoleküle Anregungs- und Emissionsspektrum auseinander.

3. Durch Stöße zweiter Art kann ein angeregtes Molekül in den Grundzustand übergehen. Dieser Prozeß ist naturgemäß stark von der Viskosität des Lösungsmittels und der Temperatur abhängig. Dabei kann die Strahlungsenergie in Wärme übergehen oder auch vom zweiten Molekül in Sekundärfluoreszenz emittiert werden. Diese sogenannte sensibilisierte Fluoreszenz wird noch genauer besprochen werden.
4. Das Matrixelement M_{k1} ist ein Vektor, deswegen ist die Übergangswahrscheinlichkeit eines Moleküls durch die Richtung des E-Vektors des eingestrahlten Lichtes relativ zu den Koordinaten des Moleküls bestimmt. Ebenso hat er auch bei der Emission eine bestimmte Richtung relativ zum Molekül.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die fluoreszierenden Eigenschaften eines Moleküls gekennzeichnet

sind durch das Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum, die Abklingzeit und die Polarisierung. Alle diese Größen sind von der lokalen Umgebung eines Moleküls abhängig. Es kann daher umgekehrt aus Änderungen dieser Eigenschaften auf Änderungen der lokalen Umgebung geschlossen werden.

Die Fluoreszenz ist eine physikalische Erscheinung, die Ähnlichkeiten mit dem Ramaneffekt hat. In beiden Fällen ist die Frequenz des wieder emittierten oder gestreuten Lichtes gegen die Frequenz des eingestrahlten Lichtes verschoben und von den Schwingungs- und Rotationszuständen des Moleküls bestimmt. Bei der Fluoreszenz haben allerdings die Rotationszustände einen geringen Einfluß. Die Frequenzverschiebungen haben auch bei beiden Effekten verschiedene Ursachen.

Bei der Fluoreszenz wird das eingestrahlte Lichtquant absorbiert. Während der etwa 10^{-7} - 10^{-9} s langen Lebensdauer des angeregten Zustandes geht ein Teil der absorbierten Energie durch Stöße mit Nachbarmolekülen verloren. Danach geht das Molekül wieder spontan in den Grundzustand über. Das Spektrum des emittierten Lichtes ist von den Schwingungszuständen des Grundzustandes bestimmt und von der Frequenz des eingestrahlten Lichtes unabhängig.

Beim Ramaneffekt wird das eingestrahlte Lichtquant nicht absorbiert. Er gibt nur in einem unelastischen Stoß einen Teil seiner Energie zur Anregung von Schwingungs- oder Rotationszuständen ab. Der Rest der Lichtquantenenergie wird dann als Streustrahlung wahrgenommen. Hier ist nur die Frequenzverschiebung durch die inneren Zustände des Moleküls bestimmt. Die Frequenz des gestreuten Lichtes ist jedoch auch von der Frequenz des eingestrahlten Lichtes abhängig.

4. Messung der Bindung des FDP und FTP an Enzymen und am AdN-Carrier

4.1 Grundsätzliche Möglichkeiten

Die Bindung eines fluoreszierenden kleinen Moleküls an einem großen Protein kann mit Hilfe der Fluoreszenz gemessen werden, wenn sich bei der Bindung entweder das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktion oder die Polarisation ändert.

4.1.1. Änderung der Quantenausbeute

Bei der Bindung kann sich die Struktur des bindenden Moleküls verzerren und die Quantenausbeute und Extinktion werden sich ändern. Dies ist insbesondere bei kovalent bindenden Molekülen zu erwarten, nicht jedoch unbedingt bei dem FDP. Entscheidender ist es aber auch in den meisten Fällen, daß sich das Molekül nach der Bindung in einer Umgebung befinden kann, deren Polarität sich von der Polarität des Lösungsmittels unterscheidet.

Wie schon besprochen wurde, kann die Quantenausbeute eines Moleküls von der Polarität des Lösungsmittels abhängen. Es läßt sich leicht zeigen, daß sich mit der Quantenausbeute auch die Abklingzeit der Fluoreszenz ändert.

Gibt es keine strahlungslosen Übergänge, werden alle angeregten Moleküle mit der Übergangsrate k_F durch Strahlung ihre Energie verlieren. Es gilt also

$$dN = N \cdot k_F \cdot dt = \frac{1}{\tau_o} \cdot N dt \quad (38)$$

(N Anzahl der angeregten Moleküle zur Zeit t,
 τ_o natürliche Abklingzeit)

Gibt es aber auch strahlungslose Übergänge mit der Übergangsrate k_S , gilt entsprechend

$$dN = (k_S + k_F) N dt = \frac{1}{\tau} N dt \quad (39)$$

Die Quantenausbeute ist aber gleich dem Verhältnis aus k_F und $k_F + k_S$, so daß folgt

$$Q = \frac{k_F}{k_F + k_S} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (40)$$

Die Abklingzeit ist demnach der Quantenausbeute proportional. Änderungen der Quantenausbeute äußern sich bei konstanter Extinktion in einer Änderung der Intensität. Von der Extinktion unabhängig ist die Abklingzeit, die damit ein besseres Maß für die Polarität der Umgebung der Bindungsstelle ist.

Ein Beispiel für diese Effekte ist die Gruppe der Naphthalensulfonate. Das Bekannteste ist das 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS). Die Fluoreszenz des ANS ist in Wasser fast total unterdrückt ($Q = 0,003$), je unpolarer aber das Lösungsmittel wird, desto mehr steigt auch die Quantenausbeute und die Abklingzeit. ANS bindet an sehr viele Enzyme und auch an Mitochondrien unter starker Steigerung der Fluoreszenz.

4.1.2. Änderung der Fluoreszenzpolarisation

Wird die Fluoreszenz relativ zur Ebene aus Einstrahlungsrichtung und Beobachtungsrichtung senkrecht polarisiert angeregt, und die Fluoreszenzintensität senkrecht zu dieser Ebene $I_{\uparrow}$ und parallel zu dieser Ebene $I_{\rightarrow}$ gemessen, so ist die Fluoreszenzpolarisation definiert als

$$P = \frac{I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + I_{\rightarrow}} \quad (41)$$

Die Theorie der Fluoreszenzpolarisation wurde von Perrin /25/ und Jablonski /26/ entwickelt.

Sei φ der Winkel zwischen der Richtung des Anregungsoszillators und dem E-Vektor des eingestrahnten Lichtes, so ist nur die Feldkomponente in Richtung des Anregungsoszillators wirksam. Die Anregungswahrscheinlichkeit ist damit proportional zum Kosinusquadrat von φ und es werden solche Moleküle bevorzugt angeregt, die in Richtung des Feldes orientiert sind. In jedem fluoreszierenden Molekül schließen der Anregungs- und Emissionsoszillator einen festen Winkel β ein. Je nach der Größe von β wird die Richtung des anregenden Lichtes auch in der Emission bevorzugt sein ($\beta = 0^\circ$) oder auch die dazu senkrechte Richtung ($\beta = 90^\circ$).

Bewegen sich die Moleküle nicht, erhielt Perrin /27/ zwischen der Polarisation P_0 und dem Winkel β die folgende Beziehung:

$$P_0 = \frac{3\cos^2\beta - 1}{\cos^2\beta + 3} \quad (42)$$

Können sich die Moleküle in einer Flüssigkeit der Viskosität η und der Temperatur T bewegen, so werden sie sich während der Lebensdauer des angeregten Zustandes aus der ursprünglichen Anregungsrichtung herausdrehen. Die Folge ist eine Abnahme der Polarisation P vom Maximalwert P_0 .

Nach Perrin ist für ein kugelförmiges Molekül mit dem Volumen V die Polarisation dann gegeben durch

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_R} \right) \quad (43)$$

$$\tau_R = \frac{\eta \cdot V}{k \cdot T} \quad (44)$$

In der Zeit τ_R drehen sich die Moleküle im Mittel um 33° aus der ursprünglichen Anregungsrichtung heraus. Die Größe

$$A = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right)^{-1} = \frac{I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + 2 \cdot I_{\rightarrow}} \quad (45)$$

wird auch die Anisotropie der Fluoreszenz genannt. Der Ausdruck $I_{\uparrow} + 2 I_{\rightarrow}$ ist die Gesamtintensität der Fluoreszenz, die der Konzentration der Moleküle proportional ist. Bewegt sich das Molekül nicht, hat die Fluoreszenz die Anisotropie A_0 , die sich nach Gleichung 45 aus P_0 berechnen läßt. A_0 oder P_0 können durch Messung der Fluoreszenzanisotropie in hochviskosen Lösungen bestimmt werden.

Wird die Temperatur T oder die Viskosität η einer Lösung verändert und gleichzeitig die Polarisierung oder die Anisotropie gemessen, so läßt sich aus Gleichung 43 ohne Kenntnis von τ die Rotationszeit τ_R bestimmen. Da T und η aber auch die Abklingzeit beeinflussen, sind große systematische Fehler möglich. Besser ist es die Rotationsdepolarisation direkt zu messen. Wird die Fluoreszenz durch einen kurzen Blitz angeregt, sind $I_{\uparrow}$ und $I_{\rightarrow}$ zeitabhängig. Nach Jablonski /28/ ergeben sich dafür die Beziehungen:

$$I_{\uparrow}(t) + 2I_{\rightarrow}(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (46)$$

$$I_{\uparrow}(t) - I_{\rightarrow}(t) = I_0 \cdot A_0 \exp(-t/[\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\tau_R}]) \quad (47)$$

Die Anisotropie klingt damit rein exponentiell mit τ_R als Abklingzeit ab.

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-t/\tau_R) \quad (48)$$

Ist das Molekül nicht kugelförmig, ist die Abklingfunktion eine Summe aus maximal fünf Exponentialfunktionen /29, 30, 31/.

Bindet nun ein kleines Molekül wie FDP an ein wesentlich größeres Enzym, so verliert es seine im Lösungsmittel vorhandene Beweglichkeit. Während der Anregungsdauer wird sich ein solches Molekül nicht wesentlich drehen, so daß die Fluoreszenzanisotropie auf den Wert A_b ansteigt, der gleich der Fluoreszenzanisotropie A_o sich nicht bewegender Moleküle sein sollte. Die Anisotropie eines ruhenden Moleküls ist aber allein durch den Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsoszillator bestimmt, und dieser kann sich durch die Bindung des Moleküls ändern. So ist damit zu rechnen, daß sich A_b von A_o unterscheidet. Gleichzeitig gibt es aber in der Lösung auch ungebundene Moleküle mit der kleineren Anisotropie A_f .

Sind in einer Lösung gleichzeitig zwei Molekülsorten vorhanden, ist die gemessene Anisotropie das Mittel der Anisotropien der beiden Molekülsorten (Weber /32/). Ein ähnlicher Zusammenhang besteht für die Polarisisation nicht. Ist f_i der relative Beitrag der i-ten Molekülsorte zur Gesamtintensität und A_i die Anisotropie, so ergibt sich nach Weber die Gesamtanisotropie zu

$$A = \frac{\sum f_i A_i}{\sum f_i} \quad (49)$$

Ist f_f der Beitrag der freien FDP-Moleküle und f_b der Beitrag der gebundenen Moleküle zur Intensität der Fluoreszenz, so ist die gemessene Anisotropie

$$A = \frac{f_f A_f + f_b A_b}{f_f + f_b} = \frac{A_f + \frac{f_b}{f_f} A_b}{1 + \frac{f_b}{f_f}} \quad (50)$$

f_f und f_b sind proportional zur Konzentration c_f der freien bzw. zur Konzentration c_b der gebundenen Moleküle.

Der Faktor $F = \frac{f_b}{f_f} : \frac{c_b}{c_f}$ ist die relative Änderung der Fluoreszenz bei Bindung, die durch eine Änderung der Quantenausbeute verursacht sein kann. Die Formel 50 läßt sich umformen in

$$A = \frac{A_f + F \frac{c_b}{c_f} A_b}{1 + F \frac{c_b}{c_f}} \quad (51)$$

Die Anisotropie ist damit bei gegebenem Enzym nur von dem Verhältnis von c_b zu c_f abhängig.

Aufgrund der kurzen Abklingzeit hat FDP auch schon in wäßriger Lösung eine Fluoreszenzanisotropie von $A_f = 0,06$. A_o läßt sich durch eine Messung der Anisotropie in konzentrierter Saccarose-Lösung bestimmen. Wie schon dargelegt ergibt dies nur eine Näherung für A_b , da damit gerechnet werden muß, daß sich durch die Bindung der Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsoszillator ändert. Für FDP ergibt sich in Saccarose-Lösung ein Wert von $A_o = 0,30$. Der tatsächliche Wert von A_b muß jedoch für jedes Enzym gesondert bestimmt werden, wie auch der Faktor F .

Im Experiment wird die Anisotropie in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration E_o und der FDP-Konzentration FDP_o gemessen. Zur Auswertung ist es nötig, einen Zusammenhang zwischen A_b , A_f , F , E_o , FDP_o , der Dissoziationskonstanten K und der gemessenen Anisotropie zu entwickeln.

Aus dem Massengleichgewicht

$$\frac{E_f \cdot FDP_f}{FDP_b} = K \quad (52)$$

läßt sich mit einer einfachen quadratischen Gleichung bei gegebenem E_o , FDP_o und K die Konzentration des freien FDP und des gebundenen FDP berechnen und damit bei gegebenem A_b , A_f und F auch die Anisotropie A . Es ist dabei bemerk-

kenswert, daß für kleine FDP-Konzentrationen ($\text{FDP}_o \ll E_o$) das Verhältnis der Konzentration des gebundenen FDP zur Konzentration des freien FDP gegen den Wert E_o / K strebt. Die gemessene Anisotropie strebt daher nicht, wie erwartet werden könnte, gegen die Anisotropie A_b , sondern gegen einen davon verschiedenen Wert A_{ob} , der sich nach Gleichung 51 ergibt zu

$$A_{ob} = \frac{A_f + F \frac{E_o}{K} A_b}{1 + F \frac{E_o}{K}} \quad (53)$$

Nur wenn die mit F multiplizierte Enzymkonzentration E_o sehr viel größer als die Dissoziationskonstante ist, ist auch A_{ob} gleich A_b .

Die Anfangssteigung der Fluoreszenzintensität ist auch nicht nur bestimmt durch den Faktor F , sondern es ergibt sich

$$\left(\frac{dI}{d\text{FDP}} \right)_o = 1 + (F - 1) \left(\frac{1}{2} - \frac{E_o - K}{2(E_o + K)} \right) \quad (54)$$

Nur aus den Anfangswerten der Meßkurven können A_b und F also nicht bestimmt werden. Es ist dazu notwendig, die gesamte Meßkurve mit theoretischen Kurven zu vergleichen.

Da FDP nur in sehr kleinen Mengen zur Verfügung stand, wurden Vorversuche mit NADH gemacht. Ähnliche Experimente wurden schon von Velick durchgeführt /33/.

Die besondere Bedeutung des NADH liegt darin, daß es reversibel Wasserstoff abgeben und aufnehmen kann und damit als Träger des Wasserstoffs im Organismus wirkt. Bild 9 zeigt die Strukturformel des NADH.

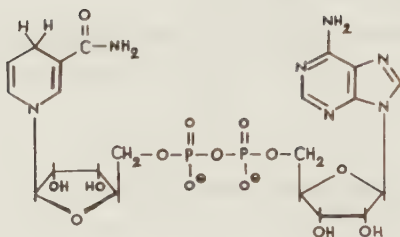
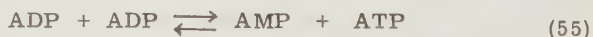


Bild 9 . Strukturformel des NADH

NADH ähnelt in seinen Fluoreszenzeigenschaften sehr dem FDP, da die Abklingzeit und die Quantenausbeute relativ klein sind ($\tau = 0,4 \text{ ns}$, $Q = 0,05$). Das Anregungsspektrum des NADH ($\lambda = 360 \text{ nm}$) überlappt sich hingegen kaum mit dem Anregungsspektrum des Tryptophans. NADH bindet mit deutlich meßbarer Anisotropieerhöhung an eine Vielzahl von Enzymen, bei keinem wird jedoch der Maximalwert $A_b = 0,4$ erreicht. Die Enzyme wurden alle von der Firma Boehringer bezogen. Bei der Lactatdehydrogenase ist $A_b = 0,3$, bei der Glutamatdehydrogenase ist aber nur $A_b = 0,2$. NADH bindet an die Lactatdehydrogenase mit deutlicher Fluoreszenzintensitätserhöhung ($F = 3,2$), während bei der Glutamatdehydrogenase die Intensität unverändert bleibt.

Es wurde dann die Bindung des FDP an die Myokinase gemessen. Die Myokinase ist ein im Organismus weitverbreitetes Enzym, das die Reaktion



katalysiert. Magnesium ist zur Reaktion notwendig.

Dieses Enzym besitzt mit $MW = 23\,000$ ein relativ kleines Molekulargewicht und enthält als einziges Enzym, das ADP bindet, kein Tryptophan, sondern nur zwei Tyrosingruppen. Das Anregungsspektrum des Tyrosins ($\lambda_{\max} = 280\text{ nm}$) überlappt sich mit dem FDP-Spektrum nicht so stark wie das Tryptophanspektrum. Bei manchen Enzymen ändert sich die Proteinfluoreszenz durch die Bindung des ADP oder FDP, dies ist jedoch bei Myokinase nicht der Fall, so daß diese Fluoreszenz einen konstanten Untergrund ergibt, der von der Gesamtintensität abgezogen werden kann. In Bild 10 sind die Meßpunkte eingetragen und einige berechnete Kurven unter der Annahme von $A_b = 0,19$ und $F = 1$. Aufgetragen ist die Anisotropie und der relative Anteil der besetzten Bindungsplätze des Enzyms (FDP_b/E_o). Mit steigender FDP-Konzentration werden die Bindungsplätze des Enzyms zwar immer mehr besetzt, da aber der Anteil des ungebundenen FDP stärker wächst, fällt die gemessene Anisotropie auf die Anisotropie des freien FDP zurück.

Die Meßwerte der Anisotropie stimmen am besten mit der unter der Annahme einer Dissoziationskonstanten von $2\mu M$ berechneten Kurve zusammen. Eine Änderung der Fluoreszenzintensität durch die Bindung des FDP an die Myokinase zeigte sich nicht ($F = 1$).

Nach Zugabe von $MgCl_2$ ist bei der Myokinase keine Anisotropieerhöhung durch die Bindung des FDP mehr meßbar. Ebenso verdrängen AMP, ADP, ATP das FDP von der Bindungsstelle.

FDP - Anisotropie

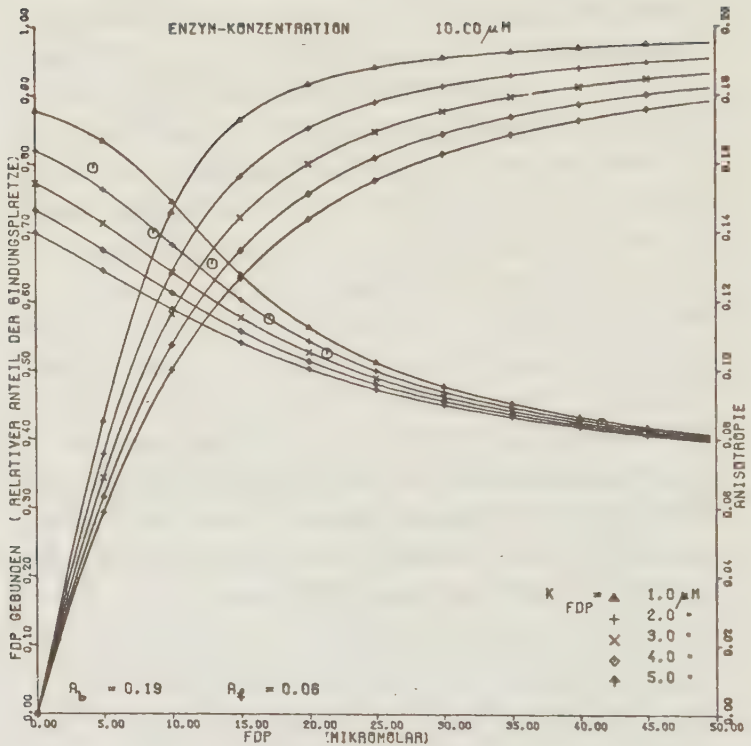


Bild 10 Bindung des FDP an Myokinase

Aufgetragen sind die gemessenen Werte der Anisotropie (durch $\circ$ gekennzeichnet), berechnete Kurven für die Anisotropie (fallende Kurven) und der Anteil der vom FDP besetzten Bindungsplätze (ansteigende Kurven). Die Kurven wurden unter der Annahme $A_b = 0,19$. $F = 1$ und der jeweils angegebenen Dissoziationskonstanten berechnet. Die Anisotropie des freien FDP ist $A_f = 0,06$ die Enzymkonzentration 10μ M.

Das gleiche Experiment wurde auch mit Enzymen durchgeführt, die ADP binden und Tryptophan enthalten. Nur bei der Pyruvat-Kinase zeigte sich eine schwache Bindung. Dies liegt aber zum Teil auch daran, daß diese Enzyme ADP nur mit einer relativ großen Bindungskonstante binden ($K \approx 50 \mu\text{M}$). Es wurden dann Rinderherz-Mitochondrien nach der im Anhang beschriebenen Methode präpariert. Der AdN-Carrier der Mitochondrien bindet ADP sehr fest ($K \approx 0,2 \mu\text{M}$), so daß es möglich sein sollte, die Bindung des FDP durch die Polarisationserhöhung nachzuweisen. In den Messungen konnte aber trotzdem keine Änderung der Polarisation gefunden werden.

Der Grund dieses Mißerfolges liegt darin, daß sich eine relativ hohe Bindung des FDP nur bei kleinen FDP-Konzentrationen und hohen Enzymkonzentrationen einstellt. Bei einer Anregung mit 310 nm ist die Fluoreszenzintensität bis zu einer Konzentration von 3 mg/ml Rinderherzmitochondrien oder $50 \mu\text{M}$ FDP proportional zur Konzentration. Sinnvoll für Messungen ist daher eine maximale Konzentration der Mitochondrien von etwa 2 mg/ml, was einer Carrierkonzentration von $2 \mu\text{M}$ entspricht. Bei einer Dissoziationskonstante von $1 \mu\text{M}$ wäre dann bei einer FDP-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ die Hälfte des FDP gebunden. Das gesamte FDP trägt bei diesen Konzentrationsverhältnissen nur etwa einen Anteil von 15 % zur Gesamtintensität bei. Messungen der Polarisation sind unter solchen Bedingungen nicht möglich.

Es mußte jetzt nach Meßmethoden gesucht werden, in denen entweder nur das gebundene FDP gemessen wird oder bei denen die Tryptophan-fluoreszenz nicht stört. Es wurden dazu parallel zwei Methoden versucht.

1. Fluoreszenzübertragung

Der Grund für das Versagen der Polarisationsmessungen war ja, daß drei verschiedenen Molekülsorten zur Fluoreszenz beitrugen: Das Tryptophan, das freie und das gebundene FDP.

Es ist daher anzustreben, eine Meßmethode zu finden, die nur die Konzentration des gebundenen FDP mißt. Hierzu kann die sogenannte strahlungslose Fluoreszenzübertragung ausgenutzt werden. Ein fluoreszierendes Molekül kann seine Anregungsenergie strahlungslos auf ein zweites Molekül übertragen, wenn das Emissionsspektrum des ersten Moleküls und das Anregungsspektrum des zweiten Moleküls zusammenfallen und wenn beide Moleküle dicht benachbart sind. Das zweite Molekül kann dann die ihm übertragene Energie in einer Sekundärfluoreszenz wieder abgeben.

Befinden sich nun solche Moleküle, die die Anregungsenergie vom FDP übernehmen können, nur innerhalb der Membran, so können nur die gebundenen FDP - Moleküle ihre Energie auf diese Art abgeben. Die Sekundärfluoreszenz wäre dann allein proportional zur Konzentration der gebundenen FDP - Moleküle.

Da die Fluoreszenzübertragung ein sehr schnell ablaufender Prozeß ist, könnten auf diese Weise auch schnelle Bindungsänderungen des FDP verfolgt werden.

2. Messung der Fluoreszenzabklingzeiten

FDP und das Tryptophan unterscheiden sich in der Abklingzeit der Fluoreszenz, unter Umständen haben auch freies und gebundenes FDP eine verschiedene Abklingzeit. Sollte es möglich sein, diese verschiedenen Abklingzeiten in einer Messung zu unterscheiden, so könnte der relative Anteil des gebundenen FDP gemessen werden.

Da für Abklingzeitmessungen immer längere Meßzeiten benötigt werden, kann nur bei stationären Bindungszuständen gemessen werden.

4.3 Fluoreszenzübertragung

4.3.1. Theorie der Fluoreszenzübertragung

Die Theorie der strahlungslosen Fluoreszenzübertragung wurde von Förster entwickelt /34, 35/. Ein angeregtes Molekül A kann strahlungslos seine Energie auf ein zweites Molekül B übertragen, wenn sich das Emissionsspektrum des Moleküls A und das Absorptionsspektrum des Moleküls B überlappen und wenn beide Moleküle einen geringen Abstand haben ($R \approx 50 - 100 \text{ \AA}$). Dies wird auch sensibilisierte Fluoreszenz genannt und von Franck und Cario an Mischungen von Quecksilber- und Thalliumdampf nachgewiesen. Die zwischen Lichtabsorption und Fluoreszenzemission verlaufenden Prozesse können zusammengefaßt werden zu



Selbstverständlich ist $h\nu \geq h\nu'$. Die quantitative Auswertung zeigte jedoch, daß dieser Energieübergang nicht ohne weiteres durch Stöße zweiter Art erklärt werden kann, da die Anzahl der Übergänge sehr viel größer ist, als es durch die kinetische Gastheorie erklärt werden kann. Der Energieübergang geschieht offenbar auch dann, wenn die Moleküle nicht aufeinanderstoßen, sondern dicht benachbart sind. Ebenso konnte auch die triviale Reabsorption des emittierten Fluoreszenzlichtes des Quecksilbers durch das Thallium ausgeschlossen werden. Ein ähnlicher Prozeß wurde von Gaviola und Pringsheim /36/ beobachtet. Sie fanden, daß die Polarisation des Fluoreszenzlichtes mit zunehmender Konzentration verschwindet. Dies wurde durch Perrin durch die Übertragung der Anregungsenergie auf anders orientierte gleichartige Moleküle gedeutet. Eine auch quantitative Theorie dieser Prozesse wurde dann von Förster geliefert sowohl auf klassischer und quantenmechanischer

Grundlage /34, 35/. Beide Behandlungen ergeben identische Resultate. Die quantenmechanische Ableitung wird hier kurz skizziert.

Es seien W_O^A und W_O^B die Energien der reinen Elektronenübergänge zweier Moleküle A und B, w_k die Kernschwingungsenergie im Grundzustand und w'_k im angeregten Zustand des Moleküls A, w_1 die Kernschwingungsenergie des Moleküls B im Grundzustand und w'_1 im angeregten Zustand. Geht jetzt ein angeregtes Molekül A durch die Übertragung seiner Energie auf das Molekül B in den Grundzustand über, so gibt es die Energie ab

$$W(A) = W_O^A + w'_k - w_k \quad (57)$$

Das Molekül B nimmt dafür die Energie auf

$$W(B) = W_O^B + w'_1 - w_1 \quad (58)$$

Ist $W = (W(A) + W(B)) / 2$ der Mittelwert beider Energien und $\Delta W = W(B) - W(A)$ die Energieänderung des Systems, so lassen sich die Kernschwingungsenergien des Endzustandes schreiben als

$$w_k = w'_k + W_O^A - W + \frac{1}{2} \Delta W \quad (59)$$

$$w'_1 = w_1 + W - W_O^B + \frac{1}{2} \Delta W \quad (60)$$

Die Wechselwirkungsenergie $u(r_k, r_1)$ beider Moleküle ist, wenn der Molekülabstand groß gegen die Bindungsabstände der Atome in den Molekülen ist, gegeben durch die Coulombsche Wechselwirkung

$$u(r_k, r_1) = -\frac{e^2}{n^2 |r_k - r_1|} \quad (61)$$

Das Matricelement des Übergangs ist dann

$$M_{k,l} = \iint \varphi_k^*(\omega_k, \tau_k) \varphi_l^*(\omega_l, \tau_l) \mu(\tau_k, \tau_l) \varphi_k(\omega_k, \tau_k) \varphi_l(\omega_l, \tau_l) d\tau_k d\tau_l \quad (62)$$

Werden in den Wellenfunktionen die Energiewerte statt der entsprechenden Quantenzahlen v_k , v'_k und v_l , v'_l zur Kennzeichnung der Kernzustände benutzt, ist dann die Übergangswahrscheinlichkeit

$$n_{kl} = \frac{2\pi}{\hbar} \int |M_{k,l}|^2 \cdot D \cdot dW \quad \text{mit} \quad \Delta W = 0 \quad (63)$$

Dabei berücksichtigt die Nebenbedingung $\Delta W = 0$ die Energieerhaltung beim Übergang und die Funktionaldeterminante

$$D = \frac{dv_k}{d\omega_k} \cdot \frac{dv'_k}{d\omega'_k} \cdot \frac{\partial(\omega_k, \omega'_k)}{\partial(W, \Delta W)} \quad (64)$$

die Koordinatentransformation von den Quantenzahlen auf die Energiegrößen W und ΔW . Die Differentialquotienten sind Termichten auf der Energieskala. Durch die Normierung der Wellenfunktionen des Endzustandes

$$\iint_{\omega_k}^{\omega_k+1} |\varphi(\omega_k, \tau_k)|^2 d\tau_k dW = 1 \quad \iint_{\omega'_k}^{\omega'_k+1} |\varphi(\omega'_k, \tau_k)|^2 d\tau_k dW = 1 \quad (65)$$

erhalten sie den Wert 1. Bei den Wellenfunktionen des Ausgangszustandes wird die übliche Normierung beibehalten.

$$\int |\varphi'(\omega_k, \tau_k)|^2 d\tau_k = 1 \quad \int |\varphi(\omega_k, \tau_k)|^2 d\tau_k = 1 \quad (66)$$

Die Übergangswahrscheinlichkeit ist dann

$$n_{kl} = \frac{2\pi}{\hbar} \int |M_{k,l}|^2 dW \quad (67)$$

Haben die Kernbewegungsenergien im Ausgangszustand keine festen Werte, so ist das gewichtete Mittel über alle möglichen Werte zu nehmen.

$$n_{kl} = \frac{2\pi}{h} \iiint g(\omega_k') g(\omega_l') |M_{kl}|^2 d\omega_k d\omega_l d\omega \quad (68)$$

Sind auch die Molekülgrößen gegen die Molekülabstände zu vernachlässigen, so kann die Wechselwirkungsenergie der Elektronen auf die Wechselwirkungsenergie zweier Dipole zurückgeführt werden. Das Matrixelement ergibt sich dann zu

$$M_{kl} = \frac{1}{n^2 R_{kl}} \left[R_{kl}^2 (M_k \cdot M_l) - 3 (M_k \cdot R_{kl}) (M_l \cdot R_{kl}) \right]$$

dabei ist

$$M_k = -e \int \psi_k^*(\omega_k, r_k) r_k \psi'(\omega_k', r_k) d\tau_k \quad (69)$$

$$M_l = -e \int \psi_l^*(\omega_l, r_l) r_l \psi'(\omega_l', r_l) d\tau_l$$

Seien φ_k und φ_l die Winkel zwischen den Momenten M_k und M_l und der Verbindungslinie der Moleküle und ist φ_{kl} der Winkel zwischen M_k und M_l , so läßt sich das Matrixelement schreiben als

$$M_{kl} = \frac{|M_k| \cdot |M_l| (\cos \varphi_{kl} - 3 \cos \varphi_k \cdot \cos \varphi_l)}{n^2 R_{kl}^3} = \frac{|M_k| \cdot |M_l| \cdot \mathcal{A}}{n^2 R_{kl}^3} \quad (70)$$

Die dimensionslose Größe $\mathcal{A}$ hängt dabei allein von der Orientierung der Moleküle ab.

Die Übergangswahrscheinlichkeit ist dann gegeben durch

$$n_{kl} = \frac{2\pi}{h n^4 R_0^6} \int_{W=0}^{\infty} \left[\int_{W'_k=0}^{\infty} g(W'_k) M_{kl}^2(W'_k, W_k) dW'_k \right] \cdot \left[\int_{W_k=0}^{\infty} g(W_k) M_{kl}^2(W_k, W'_k) dW_k \right] dW \quad (71)$$

Die beiden Integrale in den eckigen Klammern stehen aber mit meßbaren Größen in unmittelbarem Zusammenhang. Ein Vergleich mit den Gleichungen 33 und 36 zeigt, daß das erste Integral sich auf das Emissionsspektrum des Moleküls A und das zweite Integral auf das Absorptionsspektrum des Moleküls B zurückführen läßt. Durch Einsetzen ergibt sich dann die Übertragungswahrscheinlichkeit zu

$$n_{kl} = \frac{g_{c_0}^4 \ln 10 x^2}{128 \pi^6 n^4 N_1' \tau_0 R_0^6} \int f_A(\nu) \varepsilon_B(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4} \quad (72)$$

Die Übertragungswahrscheinlichkeit ist damit um so größer, je mehr sich das Emissionsspektrum des Moleküls A und das Absorptionsspektrum des Moleküls B überlappen und je kleiner der Abstand der beiden Moleküle ist.

Die Gleichung 72 kann anders geschrieben werden:

$$n_{kl} = \frac{1}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (73)$$

$$\text{mit } R_0 = \frac{g_{c_0}^4 \ln 10 x^2}{128 \pi^6 n^4 N_1'} \int f_A(\nu) \varepsilon_B(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4} \quad (74)$$

Da zwischen natürlicher Lebensdauer τ_0 , tatsächlicher Lebensdauer τ und der Quantenausbeute Q der Zusammenhang besteht

$$\tau = \tau_0 \cdot Q \quad (40)$$

ergibt sich dann beim Übergang zur bequemeren Wellenzahlskala

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \alpha^2 Q}{128 \pi^6 n^4 N^2} \int_0^\infty f_A(\bar{\nu}) \epsilon_B(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (75)$$

R_0 ist ein kritischer Abstand, bei dem die Wahrscheinlichkeit der spontanen Emission gleich der Übertragungswahrscheinlichkeit ist.

Der Abklingvorgang der Moleküle der Sorte A verläuft nicht mehr rein exponentiell. Solche Moleküle werden zuerst ihre Energie verlieren, die zufällig einen geeigneten Partner zur Fluoreszenzübertragung in ihrer Nähe haben. Die Desaktivierung der anderen Moleküle wird davon abhängen, wie schnell sie in eine zur Übertragung günstige Lage diffundieren können. Ist die Rotationsdiffusion so groß, daß die statistische Orientierung angeregter Moleküle A relativ zu den Molekülen B durch die Übertragung nicht gestört wird, erhielt Förster /37/ für den zeitlichen Verlauf der Anregungswahrscheinlichkeit der Moleküle A

$$f(t) = \exp(-t/\tau) \cdot \exp\left(-\frac{4\pi\sqrt{\pi} C R_0^3}{3} \sqrt{\frac{t}{\tau}}\right) \quad (76)$$

Ist die Rotation total behindert erhielt Steinberg /38/

$$f(t) = \exp(-t/\tau) \cdot \exp\left(-\frac{3\beta 8\pi\sqrt{\pi} C R_0^3}{3} \sqrt{\frac{t}{\tau}}\right) \quad (77)$$

In allen übrigen Fällen kann eine geschlossene Lösung nicht gegeben werden (Elkana, Feitelson, Katchalski /39/).

4.3.2. Anwendung auf den AdN - Carrier

Es ist das Ziel, die Fluoreszenzübertragung dazu auszunutzen, die Bindung des FDP am Carrier zu messen. Polarisationsmessungen scheiterten daran, daß die Fluoreszenz des ungebundenen FDP und insbesondere des Tryptophan stark störte. Wie schon dargelegt, müßten der Membran solche Moleküle zugesetzt werden, die die Anregungsenergie vom gebundenen FDP aufnehmen können und in einer Sekundäremission wieder abgeben. Diese Sekundärfluoreszenz wäre dann proportional zur Anzahl der gebundenen FDP-Moleküle.

Daß es tatsächlich möglich ist, auf diesem Weg die Bindung eines kleinen fluoreszierenden Moleküls an einem Enzym zu messen, zeigt das Beispiel des NADH (Velick /33/). Hier kann die Fluoreszenzübertragung von dem in fast allen Enzymen enthaltenen Tryptophan auf das NADH ausgenutzt werden. Das Emissionsspektrum des Tryptophan ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) und das Absorptionsspektrum des NADH überlappen sich fast vollständig, so daß ein an ein Enzym gebundenes NADH - Molekül die Energie angeregter Tryptophan - Moleküle übernehmen kann. Wird bei einer Enzymlösung die Fluoreszenz des Tryptophans angeregt ($\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$), so wird durch die Zugabe von NADH die Tryptophanfluoreszenz unterdrückt und stattdessen erscheint die Fluoreszenz des NADH ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$), die proportional zur Konzentration der gebundenen NADH-Moleküle ist.

Da das Emissionsspektrum des Tryptophan und des FDP fast zusammenfallen, wäre das NADH eigentlich auch ein geeigneter Akzeptor für die FDP - Fluoreszenz. Dies wäre besonders auch deswegen vorteilhaft, da NADH schon natürlicherweise in den Mitochondrien enthalten ist. Es zeigt sich aber leider, daß die Fluoreszenzübertragung vom FDP auf das NADH kaum nachweisbar ist. Der Hauptgrund dafür wird sein, daß sich NADH und FDP nicht in unmittelbarer Nähe befinden. Die Konzentration des NADH läßt sich auch nicht künstlich erhöhen, da die Mitochondrienmembran für NADH undurchlässig ist.

Da NADH ungeeignet ist zur Aufnahme der Fluoreszenzenergie vom FDP, mußte nach anderen Substanzen gesucht werden, die die folgenden Bedingungen erfüllen mußten:

1. Ihr Absorptionsspektrum muß sich möglichst gut mit dem Emissionsspektrum des FDP überlappen. Außerdem sollten Extinktion und Quantenausbeute groß sein.
2. Die Absorption muß bei der Anregungswellenlänge des FDP ($\approx 310 \text{ nm}$) klein sein, damit eine Direktanregung vermieden wird.
3. Sie sollten entweder kovalent an die Membran binden oder so unpolar sein, daß sie sich nur in der ebenfalls unpolaren Membran lösen.

Es erwiesen sich zwei Derivate des Anthracens als geeignet, das 9 - Vinylnanthracen und das 9 - Anthracenmaleinimid. 9 - Vinylnanthracen ist ein Produkt von Merck, 9 - Anthracenmaleinimid wurde selbst synthetisiert. Die Überlappung des Fluoreszenzspektrums des FDP mit den Absorptionsspektren der beiden Label ist den Bildern 11 und 12 zu entnehmen.

Beide Derivate erfüllen die gestellten Bedingungen. Sie sind ausgesprochen unpolar, das 9 - Anthracenmaleinimid bindet darüberhinaus kovalent an SH - Gruppen, die in großer Zahl in der Membran vorhanden sind.

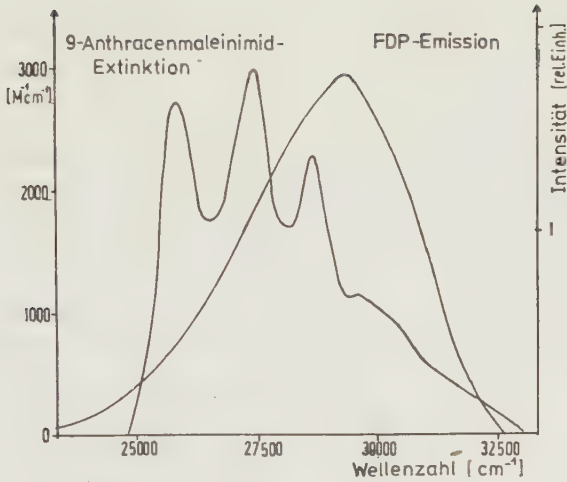


Bild 11

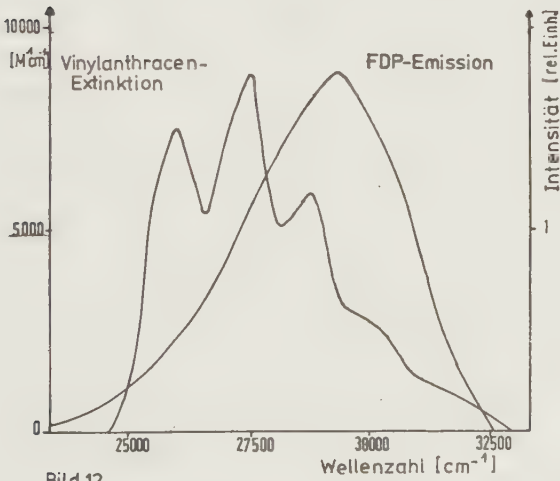


Bild 12

Bild 11,12 Überlappung der Extinktionsspektren der Fluo -
reszenzlabel mit dem Emissionsspektrum des FDP

Beide Derivate sind in Wasser so gut wie unlöslich. In organischen Lösungsmitteln wie Aceton oder Dioxan lösen sie sich gut. Dies bringt Schwierigkeiten, wenn die Mitochondrien mit diesen Fluoreszenzlabeln markiert werden sollen. Insbesondere beim 9 - Anthracenmaleinimid zeigte sich, daß nach einer Zugabe des Labels in Dioxan zu einer wäßrigen Mitochondrienlösung die Mitochondrien geschädigt wurden. Als Ausweg bot sich eine Methode an, die von Shinitzky /40/ vorgeschlagen wurde. Die Label werden zuerst auf Glaswolle aufgetragen im Verhältnis 1 g Glaswolle zu 1 mg Label und das Lösungsmittel wird vollkommen verdampft. Danach werden 50 ml Mitochondrienlösung der Konzentration 2 mg/ml mit der Glaswolle bei 0° C in Kontakt gebracht. Nach 5 Minuten haben die Mitochondrien etwa $20 \mu\text{Mol/g Protein}$ 9 - Vinylanthracen und etwa $2 \mu\text{Mol/g Protein}$ 9 - Anthracenmaleinimid aufgenommen. Das Labeln mit 9 - Anthracenmaleinimid gelingt nur, wenn die Mitochondrien durch Zugabe von ADP, Glutamat, Malat und Valinomycin energetisiert werden.

Aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit befinden sich beide Label nur innerhalb der Membran. Ihre Fluoreszenz können nur solche FDP-Moleküle auf die Label übertragen, die sich innerhalb der Membran befinden, also vom AdN-Carrier oder einer anderen Bindungsstelle in der Membran gebunden sind. Der kritische Abstand der Fluoreszenzübertragung läßt sich aus den Spektren für das 9 - Vinylanthracen zu $R_0 = 55 \text{ \AA}$ und für das 9 - Anthracenmaleinimid zu $R_0 = 46 \text{ \AA}$ berechnen. Diese Abstände liegen in der Größenordnung der Membrandicke. Freie FDP-Moleküle haben im Mittel einen zu großen Abstand, als daß eine wesentliche Übertragung möglich wäre.

Der kritische Abstand könnte experimentell bestimmt werden (Förster /35/), wenn es ein Lösungsmittel gäbe, in dem sich FDP und die Label in einem weiten Konzentrationsbereich ohne Änderung der Quantenausbeute lösen ließen.

Dies ist leider nicht der Fall. Die beiden folgenden Tests zeigen aber, daß tatsächlich eine Fluoreszenzübertragung vom FDP auf die Fluoreszenzlabel möglich ist.

1. FDP ist in beschränktem Maße in Äthanol löslich und fluoresziert dort auch mit einem nur unwesentlich veränderten Spektrum. Zu dieser Lösung können Lösungen der Label gegeben werden, ohne daß ein Ausfall der Label erkennbar ist. Wird die Fluoreszenz bei 295 nm angeregt und bei 340 nm beobachtet (optimale Anregungs- und Emissionswellenlänge des FDP), so muß bei einer Zugabe der Label die Intensität durch Fluoreszenzübertragung abnehmen (Bild 13).
2. Wird die Fluoreszenz wieder bei 295 nm angeregt aber jetzt bei maximalen Emissionswellenlängen des Anthracens (420 nm) beobachtet, so ist bei einer Zugabe von FDP nur eine geringe Fluoreszenz meßbar. Wird zu dieser Lösung aber auch noch 9 - Anthracenmaleinimid zugegeben, steigt die Fluoreszenz durch Fluoreszenzübertragung stark an. Aber schon bei Konzentrationen von $250 \mu\text{M}$ zeigt sich die Schwächung der Fluoreszenz des FDP durch das Dioxan (Bild 14).

Werden beide Label in der beschriebenen Weise in der Mitochondrienmembran eingebaut, sind sie dort innerhalb der Abklingzeit von $\tau = 6,5 \text{ ns}$ unbeweglich, wie aus Messungen der Rotationsdepolarisation geschlossen werden kann. Da das 9 - Anthracenmaleinimid kovalent an SH-Gruppen bindet, ist dies für dieses Derivat keine Überraschung. Das 9 - Vinyanthracen könnte sich aber in der Membran bewegen. In Bild 15 ist der zeitliche Verlauf von $(I_{\uparrow}(t) - I_{\rightarrow}(t)) / (I_{\uparrow}(t) + 2 \cdot I_{\rightarrow}(t))$ aufgetragen(+),

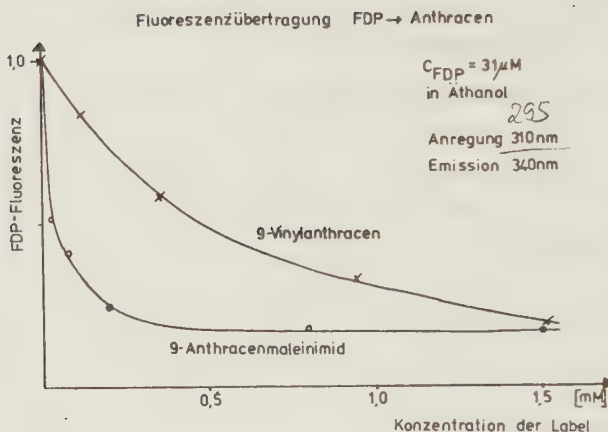


Bild 13 Unterdrückung der FDP - Fluoreszenz durch Zugaben der Fluoreszenzlabel

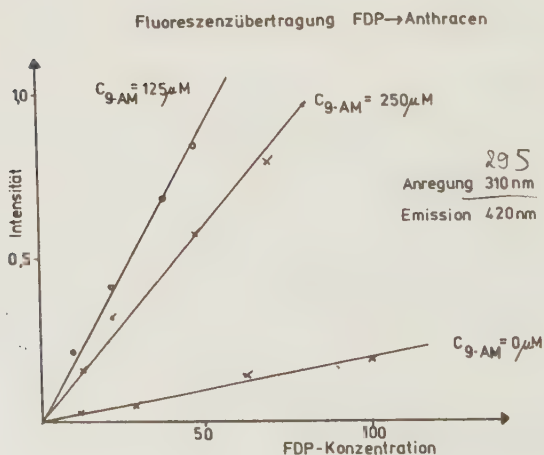


Bild 14 Anregung des 9 - Anthracenmaleinimids durch Fluoreszenzübertragung vom FDP

ANPASSUNG MIT EXPONENTIALFUNKTIONEN N = 2

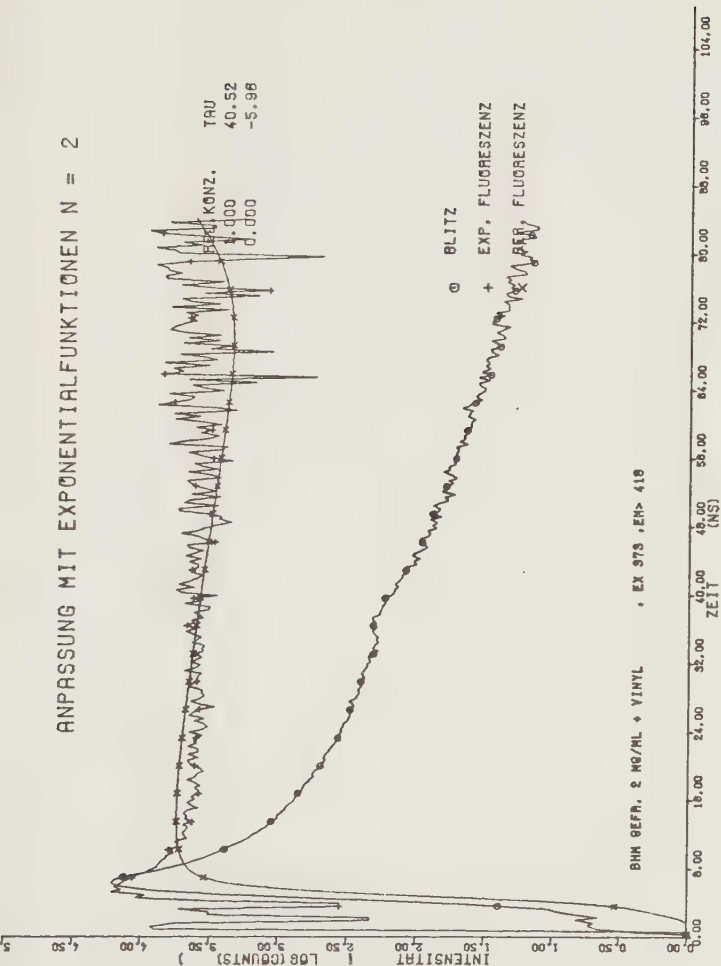


Bild 15 Rinderherzmitchondrien mit 9 - Vinylanthracen . Gemessen wird der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie des Vinylanthracens (+) . Außerdem ist angetragen der Blitz (o) und eine berechnete Fluoreszenzkurve mit den angegebenen Abklingzeiten (x) .

Zur Messung der FDP - Bindung werden den Mitochondrien in der beschriebenen Weise die Fluoreszenzlabel zugefügt. Die Fluoreszenz wird am günstigsten bei 310 nm angeregt und bei 440 bis 450 nm beobachtet. Die Beobachtungswellenlänge entspricht zwar nicht dem Emissionsmaximum des Anthracens ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$), aber erst bei dieser Wellenlänge ist die direkt angeregte Fluoreszenz des FDP vernachlässigbar. Wird nun zu der Mitochondrienlösung FDP zugegeben, so zeigt sich der im Bild 16 gezeigte Intensitätsverlauf. Schon bei einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ ist der Intensitätszuwachs fast gesättigt. Kein Zuwachs der Intensität durch Zugabe von FDP zeigt sich, wenn vorher Inhibitoren des AdN-Carriers zugegeben werden, wie Carboxyatractyloside (CAT) oder Bongkrekeic acid (BA). Beide Inhibitoren werden mit einer sehr kleinen Dissoziationskonstanten gebunden, und so ist schon kein Intensitätszuwachs durch FDP mehr meßbar, wenn die Konzentration der Inhibitoren die Konzentration des Carriers übersteigt. Der Zuwachs ist ebenso stark abhängig von der ADP-Konzentration, wie aus Bild 16 zu entnehmen ist. Schon durch eine vorher zugegebene ADP-Konzentration von $1,25 \mu\text{M}$ reduziert sich die Bindung des FDP auf 60 %. Wird die sicher stark vereinfachende Annahme gemacht, daß ADP und FDP um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, läßt sich dieses Verhalten durch eine Bindungskonstante von $5 \mu\text{M}$ für FDP und $K = 0,2 \mu\text{M}$ für ADP erklären. Ebenso zeigt sich auch keine Fluoreszenzübertragung, wenn statt des FDP das Formycinmonophosphat (FMP) zugegeben wird. FMP fluoresziert zwar genauso wie das FDP, wird jedoch wie auch das Adenosinmonophosphat (AMP) vom Carrier nicht gebunden.

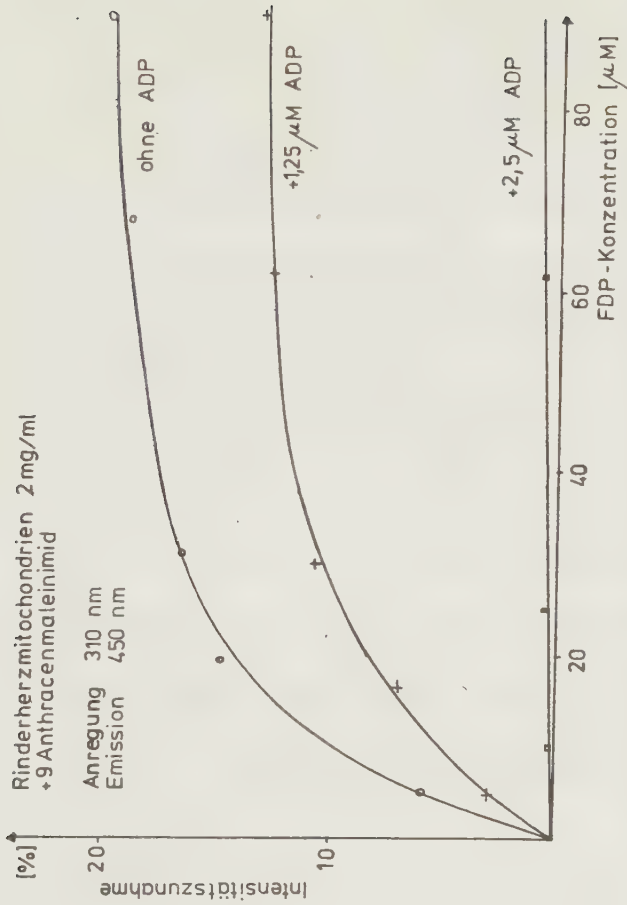


Bild 16 Nach Zugabe von FDP steigt durch Fluoreszenzübertragung auf das 9 - Anthracenmaleinimid die bei 450 nm gemessene Fluoreszenzintensität an. Der Zuwachs wird verhindert durch Zugaben von ADP, BA und CAT, da dann FDP nicht am Carrier bindet.

Durch BA, CAT und ADP läßt sich ein Intensitätsanstieg nicht nur durch vorherige Zugabe verhindern, sondern auch die nachträgliche Zugabe macht einen Intensitätsanstieg wieder rückgängig. Bild 17 zeigt dies für die beiden Label. Beim 9 - Vinylanthracen ist der Anstieg zu etwa 50 % reversibel, beim 9 - Anthracenmaleinimid jedoch vollständig. Ein Grund dafür kann sein, daß durch das Vinylanthracen auch andere Bindungsplätze als der AdN-Carrier gemessen werden.

Es zeigte sich durch die Versuche, daß das am Carrier gebundene FDP dicht benachbart zu den sich im Innern der Membran befindlichen Fluoreszenzlabeln ist. Der Abstand zu dem NADH, das sich hauptsächlich an der Oberfläche der Membran und im Innern der Mitochondrien aufhält, ist offenbar zu groß für eine Fluoreszenzübertragung. Es kann daraus geschlossen werden, daß sich das FDP den größten Teil seiner mittleren Verweilzeit am Carrier im Innern der Membran und nicht an der Oberfläche aufhält.

Grundsätzlich wäre es möglich, mit Hilfe der Fluoreszenzübertragung schnelle Bindungsänderungen des FDP zu messen. Da es aber große technische Schwierigkeiten bereitet, Mitochondrienlösungen schnell mit FDP oder anderen Reagenzien zu vermischen, wurde dies nicht weiter versucht.

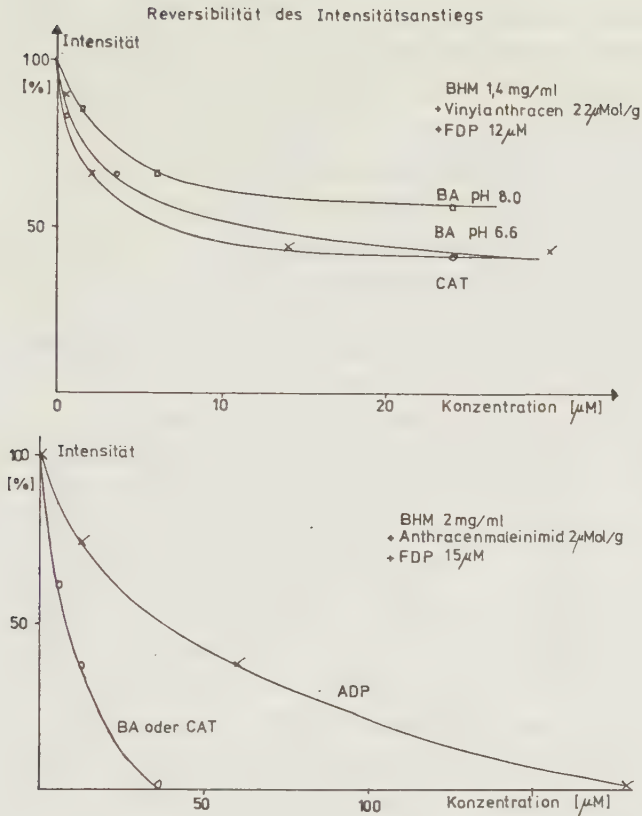


Bild 17 Die angegebenen Label werden den Rinderherzmitochondrien zugefügt . Nach der Zugabe von FDP ergibt sich durch Fluoreszenzübertragung (Anregung 310 nm , Emission 450 nm) vom gebundenen FDP ein Intensitätsanstieg (= 100 %) , der beim 9 - Vinylanthracen durch nachträgliche Zugabe der Inhibitoren CAT und BA zu etwa 50 % rückgängig zu machen ist . BA ist eine Säure und kann nur in der undissoziierten Form in die Membran gelangen und das FDP von der Bindungsstelle vertreiben , so daß BA erst bei niedrigem pH - Wert voll wirksam ist . Beim 9 - Anthracenmaleinimid ist der Intensitätsanstieg vollkommen reversibel . ADP wirkt bei beiden Labeln erst in großen Konzentrationen .

Die Bindung des FDP an den Carrier kann durch die Fluoreszenzübertragung gemessen werden. Es bleibt aber offen, wie groß die Beweglichkeit des FDP an der Bindungsstelle bzw. die Beweglichkeit des Carriers ist. Ebenso ist die Abklingzeit des gebundenen Carriers noch unbekannt. All diese Größen bestimmen jedoch die Abklingkurve der durch Fluoreszenzübertragung angeregten Anthracenderivate. Es wäre also denkbar, daß sich hieraus wenigstens angenäherte Werte für die noch unbekannten Daten gewinnen ließen.

Es wurde deshalb der Abklingvorgang der durch die Fluoreszenzübertragung angeregten Anthracenderivate gemessen. Die Messungen wurden in der Weise durchgeführt, daß in einer Küvette die Mitochondrienlösung allein und in einer anderen Küvette die Mitochondrien und FDP enthalten ist. Von beiden Proben wird abwechselnd die Abklingkurve gemessen und getrennt gespeichert. Die Differenz beider Kurven ist dann die zum FDP gehörige Abklingkurve. Durch die Fluoreszenzübertragung vom Tryptophan auf die Anthracenderivate und deren allerdings geringe Direktanregung besitzen beide Meßkurven einen gemeinsamen Untergrund, der durch die Subtraktion der beiden Kurven herausfällt. Während der Messung wird fortlaufend die Sammelrate (= Verhältnis registrierter Photonenanzahl zu Blitzzahl) notiert. Diese Werte werden dann dazu benutzt, die Kurven so zu normieren, daß sie gleicher Blitzzahl entsprechen.

Die Zuverlässigkeit solcher Messungen hängt natürlich stark von der Konstanz der Abklingkurven während der Messung ab (Dauer ca. 1/2 bis 1 h). Mögliche Schwankungen können durch eine Drift der Apparatur oder eine Instabilität der Proben hervorgerufen werden.

Die Drift der Apparatur kann mit stabilen Proben getestet werden, wie etwa Vinylanthracen in Äthanol. Es zeigt sich, daß dann zwei Abklingkurven innerhalb der statistischen Fehler übereinstimmen. Zur Sicherung der

Stabilität der Mitochondrienlösung werden diese Messungen nur bei tiefer Temperatur im Bereich 0° bis 5° C durchgeführt. Bei manchen Präparationen ist der NADH-Gehalt der Mitochondrien instabil, was sich in Schwankungen der Intensität zeigt. Zugaben von Entkopplern wie Dinitrophenol oder FCCP heben die Kopplung zwischen der Atmung und der ATP-Synthese in den Mitochondrien auf. Das NADH wird dann schnell veratmet und nimmt eine konstante kleine Konzentration ein, die die Messungen nicht mehr stört. Ob diese Zugaben notwendig sind, zeigt sich in parallel durchführbaren Messungen der Fluoreszenzintensität. Sind dort die Intensitäten konstant, so stimmen zwei Messungen wieder innerhalb der statistischen Fehler überein.

Bild 18 zeigt eine Messung mit 9 - Anthracenmaleinimid. Die Fluoreszenz wurde bei 305 nm angeregt und bei 450 nm beobachtet. Die Abklingkurve setzt sich zusammen aus der Abklingkurve des Tryptophans ($\tau = 3,5$ ns) und des Labels ($\tau = 6,5$ ns): Die in der beschriebenen Weise gemessene allein zum FDP gehörige Abklingkurve (durch + gekennzeichnet) läßt sich gut anpassen, wenn für FDP eine Abklingzeit von $\tau = 2$ ns angenommen wird. Die Genauigkeit, mit der auf diese Weise die Abklingzeit des gebundenen FDP bestimmt wird, ist jedoch nicht sehr groß. Die Auswertungen ergeben nur, daß die Abklingzeit des FDP zwischen 1,5 ns und 2,5 ns liegen muß, die damit größer als die Abklingzeit des freien FDP ist ($\tau = 0,95$ ns).

Der Einfluß des Rotationszustandes der FDP-Moleküle auf ihren Abklingvorgang bei Fluoreszenzübertragung ist relativ gering, wie die Gleichungen 76 und 77 zeigen. Deswegen ist es unmöglich, von der davon abhängigen Abklingkurve der Anthracenlabel auf die Beweglichkeit des FDP zurück-zu-schließen.

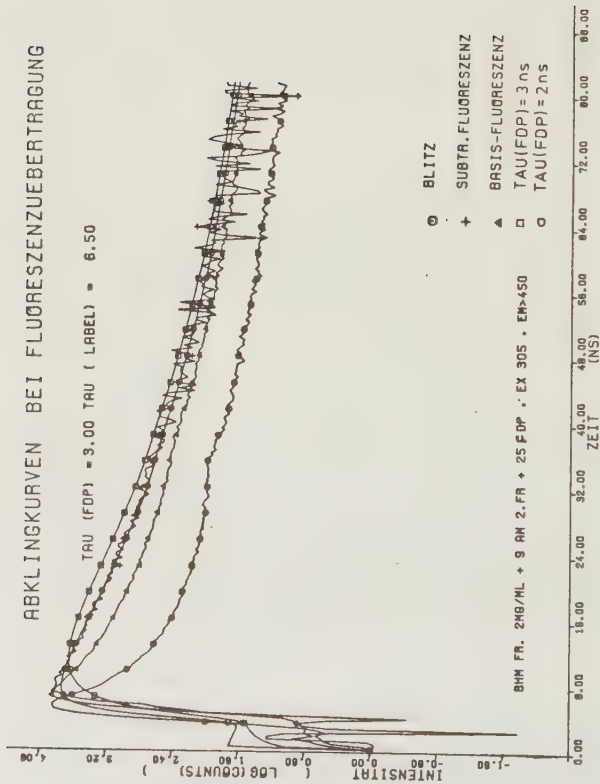


Bild 18 Abklingkurve des durch Fluoreszenzübertragung angeregten 9 - Anthracenmalein - imids . Eine gute Anpassung ergibt sich , wenn für das gebundene FDP eine Abklingzeit von 2 ns angenommen wird . Außerdem sind angetragenen Blitz (○) und die Fluoreszenz der Mitochondrienlösung ohne FDP (◇) .

4.4. Messung der Abklingzeit des gebundenen FDP

Die Messung der Abklingkurve, der durch die Fluoreszenzübertragung angeregten Anthracenlabel, gab schon den Hinweis, daß FDP mit erhöhter Abklingzeit gebunden wird. Genauere Werte kann nur eine Direktmessung der Abklingkurve des FDP geben.

Die Abklingzeit des gebundenen FDP kann wieder nur durch Differenzmessungen bestimmt werden, denn selbst wenn das FDP mit veränderter Abklingzeit gebunden wird, ist es unmöglich, in einer Messung die Abklingzeit des Tryptophans und die des freien und gebundenen FDP zu unterscheiden. Die Differenzmessungen werden in der schon beschriebenen Weise durchgeführt, indem die Mitochondrienlösung in zwei gleiche Küvetten gefüllt wird. In eine der Küvetten wird FDP in solch einer Konzentration gegeben, daß der größte Teil des FDP gebunden wird. Von beiden Lösungen werden die Abklingkurven abwechselnd gemessen und getrennt gespeichert. Die Differenz beider Kurven entspricht der Fluoreszenz des FDP allein. Die Fluoreszenz wird bei 305 nm angeregt und bei 340 nm beobachtet. Bild 19 zeigt den Vergleich der Abklingkurven des FDP mit und ohne vorherige Zugabe von CAT. Bei vorheriger Zugabe kann FDP nicht vom Carrier gebunden werden, und es wird die Abklingzeit des freien FDP mit $\tau = 0,96$ ns gemessen. Ohne CAT ergibt sich eine Abklingzeit von $\tau = 2,00$ ns. Bild 20 zeigt eine solche Messung noch einmal in logarithmischer Abtragung.

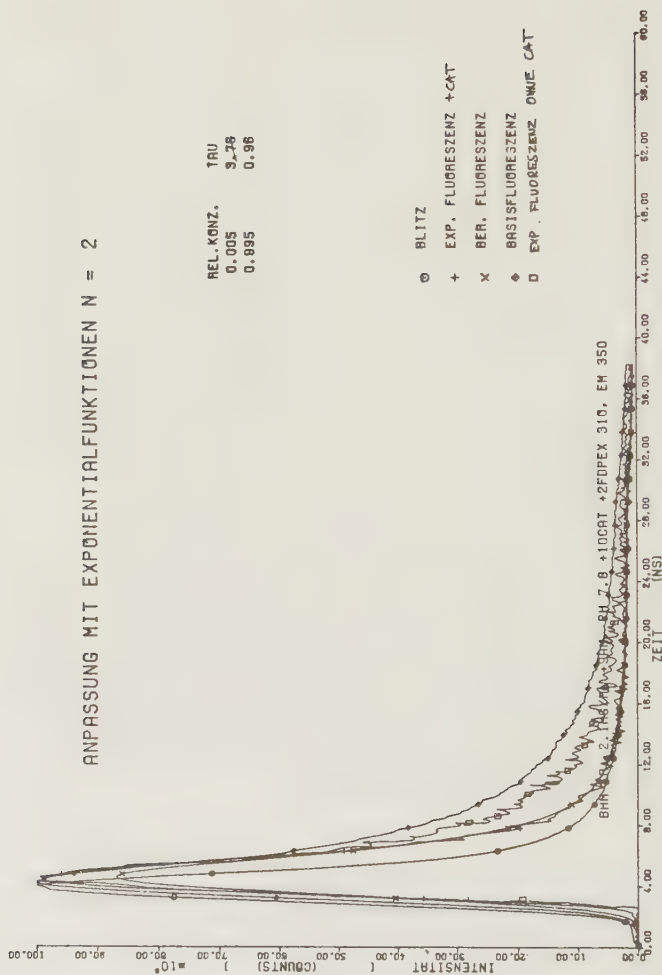


Bild 19 Vergleich der Fluoreszenzabklingkurven des FDP ($2\mu\text{M}$) mit (+) und ohne (□) Zugabe des Inhibitors CAT zur Mitochondrienlösung ($2,1\text{ mg/ml}$). Angetragenen ist außerdem der Blitz (○), die Fluoreszenz der Mitochondrienlösung ohne FDP und eine berechnete Fluoreszenzkurven mit den angegebenen Abklingzeiten .

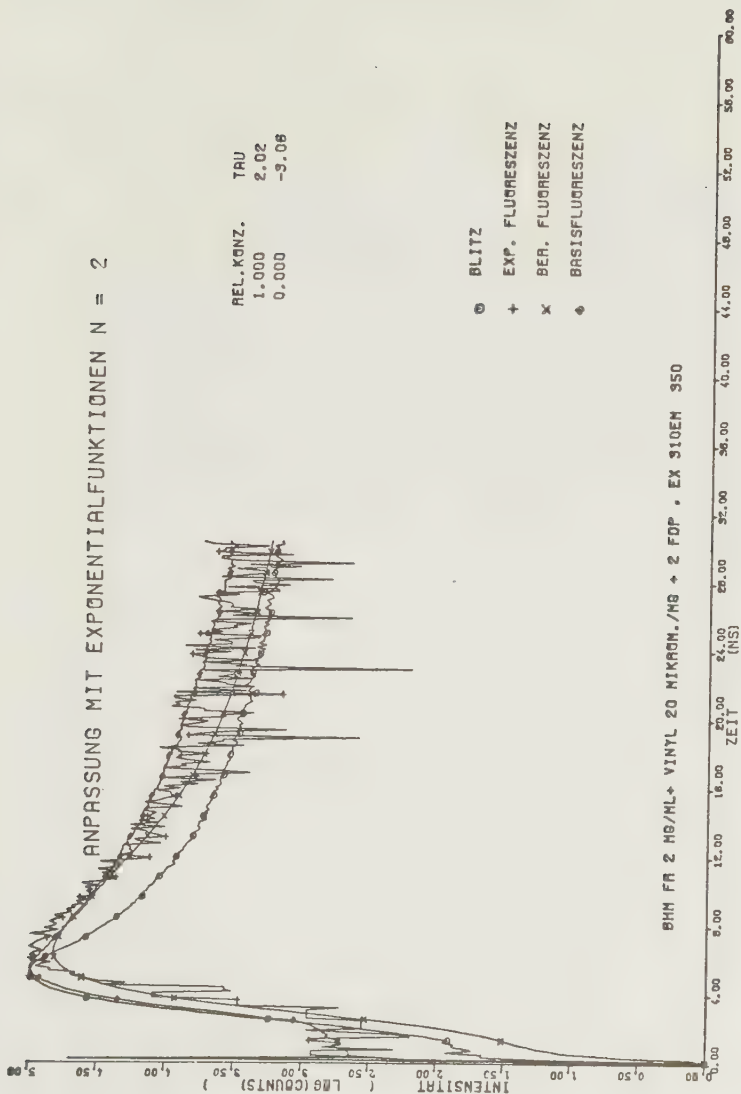


Bild 20 Fluoreszenzabklingkurve des gebundenen FDP (+). Außerdem sind angetragen Blitz (○), berechnete Fluoreszenzkurve für eine Abklingzeit von 2 ns (x) und die Fluoreszenz der Mitochondrienlösung ohne FDP (◆).

FDP erhöht also bei der Bindung an den Carrier seine Abklingzeit. Über die Gründe geben die Abklingkurven des FDP in Äthanol einen Hinweis. Leider kann beim FDP die Abhängigkeit der Abklingzeit von der Polarität des Lösungsmittels nur schlecht untersucht werden. FDP löst sich nämlich nur gut in Wasser, schon sehr schlecht in Äthanol und in anderen organischen Lösungsmitteln überhaupt nicht. Bei der Lösung in Äthanol ändern sich die Spektren nicht wesentlich, die Abklingzeit erhöht sich aber auf 2,5 ns. Schon bei einem Wassergehalt von 10 % geht die Abklingzeit wieder auf 1,6 ns zurück. Es liegt daher nahe zu vermuten, daß auch die Bindungsstelle des FDP im AdN-Carrier eine geringe Polarität aufweist und das FDP-Molekül weitgehend vom Wasser abgeschirmt ist. Beim Transport wird also der Carrier das FDP - Molekül einhüllen und dann durch die Membran schieben.

4.5. Messung der Rotation des FDP-Moleküls.

Unbekannt ist jetzt noch die Beweglichkeit des Carriers, auf die von der Beweglichkeit des gebundenen FDP - Moleküls geschlossen werden kann. Aufschluß darüber kann nur eine Messung der zeitlichen Änderung der FDP - Polarisation geben.

Es wurde deshalb versucht, die zeitliche Depolarisation der FDP-Fluoreszenz zu messen. Hier stößt man aber schon an die Grenzen der Meßapparatur. Da durch die jetzt notwendigen Polarisatoren im Strahlengang etwa 90 % der Intensität absorbiert wird, erreichen nur wenige Photonen den Photomultiplier (etwa pro 60 bis 100 Blitzen eines). Die Meßzeit kann jedoch bei lebenden Mitochondrien auch bei einer Temperatur von 0° C nicht wesentlich über eine Stunde ausgedehnt werden. Es zeigt sich aber, daß im Rahmen der erreichbaren Meßgenauigkeit die Abklingkurven $I_{\uparrow}(t)$ und $I_{\rightarrow}(t)$ aufeinanderfallen. Dies ist immer dann nach den Gleichungen 46 und 47 der Fall, wenn die Rotationsdiffusionszeit sich von der Emissionsabklingzeit wesentlich unterscheidet. Die Emissionsabklingzeit des FDP-Moleküls hat sich aber durch die Bindung auf etwa 2,00 ns erhöht. Das Molekül befindet sich damit nicht mehr in einer wäßrigen Umgebung und damit wird auch die Rotationsdiffusionszeit größer sein als im relativ niedrig viskosen Wasser (τ_R in Wasser $\approx 0,2$ ns). Die Gleichheit der Meßkurven von $I_{\uparrow}(t)$ und $I_{\rightarrow}(t)$ kann daher nur so gedeutet werden, daß die Rotationsdiffusionszeit wesentlich größer als 2 ns ist also mindestens etwa 20 ns. Es sollte daran erinnert werden, daß die Rotationsdiffusionszeit die Zeit ist, die ein Molekül für eine Drehung um 33° im Mittel braucht. Für eine Volldrehung ist damit ungefähr eine Zeit von $0,15 \mu s$ notwendig.

Nach den Meßergebnissen entfällt vollkommen die Möglichkeit, daß das FDP-Molekül durch wasserenthaltende Poren durch die Membran gelangt. Das Molekül wird sicher von einem Protein - dem Carrier - gebunden, von ihm vollkommen umschlossen und damit weitgehend vom Wasser abgeschirmt. Die Inhibitoren CAT und BA verhindern schon die Bindung des FDP und nicht erst den Transport des gebundenen Moleküls.

Die Genauigkeit der Messung reicht allerdings noch nicht aus, um festzustellen, welcher Typ eines Carriers vorliegt, da die Abklingzeit des FDP klein gegen die zu erwartenden Rotationszeiten ist.

Für die Zukunft am aussichtsreichsten sind wohl Versuche mit dem isolierten Carrier. Hier sind inzwischen große Fortschritte gemacht worden /48/. Zur Isolierung ist aber die Zugabe von CAT notwendig, und es gelingt noch nicht, das CAT nachher zu entfernen. Sollte diese Schwierigkeit aber überwunden werden, könnte durch Fluoreszenzübertragung vom FDP auf geeignete Fluoreszenzlabel (wie etwa das 9 - Anthracenmaleinimid) die Bindungsstelle und der weitere Aufbau des Carriers untersucht werden.

4. 6. Zusammenfassung

Das Adenosindiphosphat (ADP) gelangt nur durch Bindung an den AdN - Carrier durch die Mitochondrienmembran. Der Aufbau dieses Carriers und seine Wirkungsweise ist jedoch weitgehend unbekannt. Dieser Transportprozeß wurde mit einem fluoreszierenden Analog des ADP dem Formycindiphosphat (FDP) näher untersucht.

FDP unterscheidet sich in seiner Struktur kaum vom ADP und wird auch vom AdN - Carrier durch die Membran transportiert, es fluoresziert jedoch wesentlich stärker als das ADP. Bei einem fluoreszierenden Molekül ist die Fluoreszenzabklingzeit abhängig von der Polarität der Umgebung des Moleküls, während die Fluoreszenzpolarisation ein direktes Maß für die Beweglichkeit des Moleküls ist. Durch die Messung beider Größen sollten daher auch Aussagen über die Bindungsstelle des FDP im Carrier möglich sein.

Die Bindung des FDP am AdN - Carrier kann durch Fluoreszenzübertragung vom gebundenen FDP auf Anthracenderivate, die der Membran zugefügt wurden, quantitativ gemessen werden. Eine Fluoreszenzübertragung konnte nur für die sich im Innern der Membran aufhaltenden Anthracenderivate nachgewiesen werden, nicht jedoch für das NADH, das schon natürlicherweise in den Mitochondrien enthalten ist und sich hauptsächlich an der Oberfläche der Membran befindet. Dies bedeutet, daß sich die am Carrier gebundenen Moleküle auch zum größten Teil im Innern der Membran aufhalten.

Das FDP verdoppelt nach der Bindung an den AdN - Carrier seine Fluoreszenzabklingzeit, was nur so gedeutet werden kann, daß das Molekül vollkommen vom Carrier in einer unpolaren Umgebung eingehüllt und vom Wasser abgeschirmt wird.

Das gebundene FDP - Molekül verliert außerdem vollkommen seine in der wäßrigen Lösung vorhandene Beweglichkeit.

Die Rotationszeit des Carriers ist damit sicher größer als $0,15 \mu$ - Sekunden.

5. Anhang

5.1 Erläuterungen des Programms zur Bestimmung der Abklingzeiten nach der Methode der Momente.

A) THEORIE

Zwischen gemessener Fluoreszenzfunktion $F(t)$ und Blitzfunktion $E(t)$ besteht der Zusammenhang

$$F(t) = \int_0^t E(t-t') f(t') dt' \quad (80)$$

Ist die Fluoreszenzabklingfunktion $f(t)$ eine Summe von Exponentialfunktionen

$$f(t) = \sum_{i=1}^N \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (81)$$

ergibt sich zwischen den Momenten des Blitzes

$$m_k = \int_0^{\infty} t^k E(t) dt \quad (82)$$

und den Momenten der Fluoreszenz

$$\mu_k = \int_0^{\infty} t^k F(t) dt \quad (83)$$

der Zusammenhang

$$\begin{aligned} \mu_k &= \int_0^{\infty} t^k \int_0^t E(t-t') f(t') dt' dt \quad (84) \\ &= \int_0^{\infty} f(t) \int_0^{\infty} (u+t)^k E(u) du dt \\ &= k! \sum_{s=1}^{k+1} G_s m_{k+1-s} / (k+1-s) \end{aligned}$$

Dabei ist

$$G_s = \sum_{i=1}^N \alpha_i \tau_i^s \quad (85)$$

Sind die Momente bekannt, läßt sich aus dem Gleichungssystem der Satz der G_s bestimmen. Die Auflösung des nicht-

linearen Gleichungssystems nach den Abklingzeiten τ_i und den Amplituden α_i lässt sich auf die Lösung eines Polynoms vom Grad N zurückführen (Methode von Prony /42/).

Die gesuchten Abklingzeiten seien die Lösung des Polynoms

$$\tau^N - \beta_1 \tau^{N-1} - \beta_2 \tau^{N-2} - \dots - \beta_N = 0 \quad (86)$$

Wird nun die erste Gleichung des Systems 85 mit $-\beta_N$, die zweite mit β_{N-1} , die N-te Gleichung mit β_1 und die N+1 te Gleichung mit + 1 multipliziert und dann addiert, ergibt sich

$$G_{N+1} - \beta_1 G_N - \dots - \beta_N G_1 = 0 \quad (87)$$

In ähnlicher Weise ergeben sich weitere N-Gleichungen, indem nacheinander mit der zweiten, dritten, N-ten Gleichung des Systems 85 die gleiche Prozedur angewandt wird.

$$\begin{array}{rcl} G_{N+1} & = G_N \beta_1 + G_{N-1} \beta_2 + \dots & + G_1 \beta_N \\ G_{N+2} & = G_{N+1} \beta_1 + G_N \beta_2 + \dots & + G_2 \beta_N \\ G_{N+3} & = G_{N+2} \beta_1 + G_{N+1} \beta_2 + \dots & + G_3 \beta_N \\ & \vdots & \vdots \\ & \vdots & \vdots \\ G_{2N} & = G_{2N-1} \beta_1 + G_{2N-2} \beta_2 + \dots & + G_N \beta_N \end{array} \quad (88)$$

Hieraus können die Unbekannten β_i leicht ermittelt werden.

Die Abklingzeiten ergeben sich dann als Lösung des Polynoms.

Die Amplituden können dann aus dem System 85 bestimmt werden.

Es zeigte sich jedoch, daß das Verfahren sicherer konvergierte, wenn die Amplituden aus den Normalgleichungen nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet wurden.

Die Momente sind nicht direkt experimentell bestimmbar, sondern nur die Näherungen

$$\tilde{m}_k = \int_0^{T_m} t^k E(t) dt \quad \tilde{\mu}_k = \int_0^{T_m} t^k F(t) dt \quad (89)$$

Es wird daher zuerst versucht, die Fluoreszenzfunktion durch eine Abklingzeit anzupassen. Diese läßt sich aus den genäherten Momenten berechnen zu

$$\tau = \frac{G_2}{G_1} = \frac{\mu_1}{\mu_0} - \frac{m_1}{m_0} \quad (90)$$

Mit dieser genäherten Abklingzeit oder auch mehreren genäherten Abklingzeiten kann die Fluoreszenzkurve über T_m hinaus extrapoliert werden. Es lassen sich dann damit Korrekturen der Momente errechnen.

Für $t \geq T_m$ gilt

$$E(t) = 0 \quad F(t) = \sum_{i=1}^N \alpha_i f_i \exp\left(-\frac{t-T_m}{\tau_i}\right) \quad (91)$$

$$\text{mit} \quad f_i = \int_0^{T_m} E(t') \exp\left(-\frac{T_m-t'}{\tau_i}\right) dt' \quad (92)$$

$$\text{es ist also } F(T_m) = \sum_{i=1}^N \alpha_i f_i \quad (93)$$

Für die Momente der Fluoreszenz ergeben sich daher die Korrekturen

$$\begin{aligned} \delta \tilde{\mu}_k &= \sum_{i=1}^N \alpha_i f_i \int_{T_m}^{\infty} t'^k \exp\left(-\frac{t'-T_m}{\tau_i}\right) dt' \\ &= \sum_{i=1}^N \alpha_i f_i \exp\left(\frac{T_m}{\tau_i}\right) \int_{T_m}^{\infty} t'^k \exp\left(-\frac{t'}{\tau_i}\right) dt' \end{aligned} \quad (94)$$

Die Integrale ergeben sich durch Rekursion

$$J_i^k = \int_{T_m}^{\infty} t'^k \exp\left(-\frac{t'}{\tau_i}\right) dt' \quad (95)$$

$$\begin{aligned} J_i^0 &= \tau_i \\ J_i^1 &= T_m \tau_i + J_i^0 \tau_i \\ J_i^2 &= T_m^2 \tau_i + 2 J_i^1 \tau_i \\ &\vdots \\ J_i^k &= T_m^k \tau_i + J_i^{k-1} \tau_i \end{aligned} \quad (96)$$

Mit den neuen Näherungen für die Momente läßt sich ein neuer Satz von Abklingzeiten und Amplituden berechnen. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, bis sich die Abklingzeiten nicht mehr ändern.

Zur Beschleunigung der Konvergenz können Blitz und Fluoreszenzfunktion mit einer Exponentialfunktion

$\exp(-\omega t)$ ($\omega > 0$) multipliziert werden.

$$\begin{aligned} F_{\omega}(t) &= \exp(-\omega t) F(t) & E_{\omega}(t) &= \exp(-\omega t) E(t) \\ F_{\omega}(t) &= \int_0^t \exp(-\omega t) E(t-t') \cdot f(t') dt' \\ &= \int_0^t \exp(-\omega(t-t')) E(t-t') \exp(-\omega t') f(t') dt' \\ F_{\omega}(t) &= \int_0^t E_{\omega}(t-t') f_{\omega}(t') dt' \\ \text{mit } f_{\omega}(t) &= f(t) \cdot \exp(-\omega t) \end{aligned} \tag{97}$$

Die transformierten Funktionen sind wieder durch das Faltungsintegral verbunden. Aus $f_{\omega}(t)$ lassen sich leicht die Abklingzeiten der eigentlich gesuchten Abklingfunktion $f(t)$ ermitteln, da gilt:

$$f(t) = f_{\omega}(t) \cdot \exp(\omega t) \tag{98}$$

PRAKTISCHE DURCHFÜHRUNG

Die Rechnungen wurden am Leibniz-Rechenzentrum München mit der Großrechenanlage TR 440 von Telefunken durchgeführt.

Die Meßdaten werden vom Lochstreifen über einen Plattenspeicher eingelesen und in Arrays gespeichert. Kurvenverzerrungen durch hohe Sammelraten werden mit der Prozedur PILE korrigiert.

```

'PROCEDURE'PILE(E,N,NOP),, 'VALUE'NOP,,
'ARRAY'E,, 'INTEGER'N,, 'REAL'NOP,,
'BEGIN'
'COMMENT' PILE KORRIGIERT DIE KURVENVERZERKUNG BEI HOHEN SAMMELRATEN,,
'REAL'XP,,
XP:=0,, 'FOR'I.=2'STEP'1'UNTIL'N'DO'XP:=XP+E(/I/),,
NOP:=XP*NOP,, XP:=C,,
'FOR'I.=2'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
XP:=XP+E(/I/),, E(/I/):=E(/I/)*NOP/(NOP-XP),,
'END'I,,
'END'PILE,,

```

Die Counts N_i , die im i-ten Kanal des Vielkanalanalysators gezählt wurden, sind proportional den Photonen, die in der Zeitspann $t_i - \frac{1}{2} \Delta t$ bis $t_i + \frac{1}{2} \Delta t$ von der Probe emittiert werden (Δt Kanalbreite).

$$\begin{aligned}
 N_i &\sim \int_{t_i - \frac{1}{2} \Delta t}^{t_i + \frac{1}{2} \Delta t} F(t) dt \\
 &\approx F(t_i) \Delta t = F_i \Delta t
 \end{aligned} \tag{99}$$

Die Funktion $F(t)$ kann in der Nähe von F_i durch ein Polynom zweiten Grades angenähert werden.

$$\begin{aligned}
 F(t) &= F_i + \frac{F_{i+1} - F_{i-1}}{2} s + \frac{F_{i+1} - 2F_i + F_{i-1}}{2} s^2 \\
 t &= t_i + \Delta t \cdot s
 \end{aligned} \tag{100}$$

Die Momente ergeben sich dann zu

$$\begin{aligned}
 \mu_k &= \int_0^{T_m} t^k F(t) dt = \sum_{i=1}^{256} \int_{t_i - \frac{1}{2} \Delta t}^{t_i + \frac{1}{2} \Delta t} t^k F(t) dt \\
 &= \sum_{i=1}^{256} \Delta t \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} (t_i + \Delta t \cdot s)^k \left(F_i + \frac{F_{i+1} - F_{i-1}}{2} s + \frac{F_{i+1} - 2F_i + F_{i-1}}{2} s^2 \right) ds
 \end{aligned} \tag{101}$$

Ferner sei

$$A_i^0 := F_i \quad ; \quad A_i^1 := \frac{F_{i+1} - F_{i-1}}{2} \quad ; \quad A_i^2 := \frac{F_{i+1} - 2F_i + F_{i-1}}{2} \quad (102)$$

Damit folgt dann

$$\tilde{\mu}_k = \sum_{i=1}^{256} \Delta t \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} (i \Delta t + s \Delta t)^k \sum_{s=0}^2 A_i^s s^s ds \quad (103)$$

Die Momente des Blitzes wurden entsprechend berechnet.
Zur weiteren Rechnung ist es einfacher, die zeitlich normierten Momente zu benutzen.

$$\bar{\mu}_k = \frac{\tilde{\mu}_k}{(\Delta t)^{k+1}} = \sum_{i=1}^{256} \sum_{\mu=0}^k \sum_{s=0}^2 \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} \binom{k}{\mu} i^{k-\mu} s^{\mu+s} A_i^s ds \quad (104)$$

$$\bar{\mu}_k = \sum_{i=1}^{256} \sum_{\mu=0}^k \sum_{s=0}^2 \binom{k}{\mu} i^{k-\mu} A_i^s \frac{2}{\mu+s+1} \cdot E(\mu+s+1)$$

dabei ist

$$E(\mu+s+1) = \begin{cases} 0 & \text{wenn } \mu+s+1 \text{ gerade} \\ 1 & \text{wenn } \mu+s+1 \text{ ungerade} \end{cases}$$

Die aus diesen Momenten ermittelten Abklingzeiten ergeben durch Multiplikation mit Δt die wahren Abklingzeiten.

Die Momente werden durch den folgenden Programmteil berechnet. NN ist dabei die Zahl der Datenpunkte. Die Meßkurven des Blitzes und der Fluoreszenz konnten vorher mit

einer Exponentialfunktion mit wählbarer Abklingzeit multipliziert werden. Das Ergebnis ist dann im Array RX (Blitz) und Array RS (Fluoreszenz) gespeichert.

```

FOR I.=2 STEP 1 UNTIL NN-1 DO
  BEGIN
    COMMENT 'BERECHNUNG DER EXPERIMENTELLEN MOMENTE'
    FA(0/)=RS(I/), FA(1/)=(RS(I+1/)-RS(I-1/))/2.,
    FA(2/)=(RS(I+1/)-2*RS(I/)+RS(I-1/))/2.,
    IF NEU THEN
      BEGIN
        FE(0/)=RX(I/), FE(1/)=(RX(I+1/)-RX(I-1/))/2.,
        FE(2/)=(RX(I+1/)-2*RX(I/)+RX(I-1/))/2.,
      END
    XX(0/)=1., FOR J.=1 STEP 1 UNTIL RR DO XX(J/)=XX(J-1/)*(1-MM+1/),
    FOR J.=0 STEP 1 UNTIL RR DO
      FOR K.=0 STEP 1 UNTIL J DO
        FOR L.=0 STEP 1 UNTIL 2 DO
          BEGIN
            X1=(L+K)/2., IF ENTIER(X1)-X1 GREATER 1=5 THEN
              BEGIN
                S1=FUK(J,K/)*XX(J-K/)*NE(K,L/),
                MUK(J/)=MUK(J/)+FA(L/)*S1,
                IF NEU THEN MK(J/)=MK(J/)+FE(L/)*S1,
              END
            END
          END
        END
      END
    PRINT('MOMENTE DER ANREGUNG'), MK,
    PRINT('MOMENTE DER EMISSION'), MUK,
  
```

Zuerst wird versucht, die Fluoreszenzfunktion durch eine Abklingzeit anzunähern. Dies läßt sich aus den Momenten berechnen zu

$$\tilde{\tau} = \frac{\mu_1}{\mu_0} - \frac{m_1}{m_0} \quad \tilde{\alpha} = \frac{\mu_0}{m_0 \tilde{\tau}} \quad (105)$$

Zur Vermeidung von Rundungsfehlern im weiteren Verlauf der Rechnung werden die Momente erneut normiert.

$$\hat{m}_k = \frac{\overline{m}_k}{\tilde{\tau}^k} \quad \hat{\mu}_k = \frac{\mu_k}{\tilde{\alpha} \tilde{\tau}^k} \quad (106)$$

Jetzt wird versucht, die Fluoreszenzfunktion mit Hilfe von zwei Exponentialfunktionen anzupassen. Ausgangswerte sind dabei

$$\tau_1 = \frac{2\tilde{\tau}}{3} \quad \tau_2 = \frac{4\tilde{\tau}}{3} \quad (107)$$

Die dazugehörigen Amplituden werden nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Dazu wird für jede Abklingzeit τ_j der Satz der Werte

$$f_j(t_i) = \int_0^{t_i} E(t-t') \exp\left(-\frac{t'}{\tau_j}\right) dt' \quad (108)$$

berechnet. Das statistische Gewicht eines Meßpunktes $F(t_i)$ ist bei der Poisson-Statistik gerade $1/F(t_i)$, so daß sich die Normalgleichungen ergeben zu

$$\begin{aligned} \alpha_1 \left[\frac{f_1(t_i) f_1(t_i)}{F(t_i)} \right] + \dots + \alpha_n \left[\frac{f_n(t_i) f_n(t_i)}{F(t_i)} \right] &= [f_1(t_i)] \\ \vdots & \\ \alpha_1 \left[\frac{f_n(t_i) f_1(t_i)}{F(t_i)} \right] + \dots + \alpha_n \left[\frac{f_n(t_i) f_n(t_i)}{F(t_i)} \right] &= [f_n(t_i)] \end{aligned} \quad (109)$$

Es zeigte sich, daß dieses und auch alle folgenden Gleichungssysteme schlecht konditioniert sind. Es wird deswegen mit doppelter Genauigkeit und iterativer Nachbesserung der Lösungen gerechnet.

Seit $A \cdot \vec{x} = \vec{b}$ ein Gleichungssystem, dessen Lösung $\vec{x}$ gesucht ist, so ergibt sich diese mit den üblichen Lösungsmethoden nur angenähert zu

$$\tilde{\vec{x}} = \vec{x} + \delta \vec{x} \quad (110)$$

Zur Bestimmung des Fehlers $\delta \vec{x}$ wird zuerst das Residuum mit doppelter Genauigkeit bestimmt

$$\delta \vec{b} = A \vec{x} - \vec{b} \quad (111)$$

Der Fehler $\delta \vec{x}$ ergibt sich dann aus dem Gleichungssystem

$$A \delta \vec{x} = \delta \vec{b} \quad (112)$$

Eine neue Näherung für die Lösung ist dann

$$\vec{x} = \tilde{x} - \delta \vec{x} \quad (113)$$

Dieses Verfahren wird so lange wiederholt bis gilt

$$\frac{|\delta \vec{x}|}{|\vec{x}|} < 10^{-10} \quad (114)$$

Im folgenden Programmteil ist N die Anzahl der Exponentialfunktionen mit denen die Meßkurven angepaßt werden sollen. Im Fall CASE = TRUE wurden die Meßkurven mit einer Exponentialfunktion (gegeben im Array ROOT) multipliziert. Ist FALL = TRUE werden die Gewichte aus den Momenten bestimmt, nur die Werte $f_j(t_E)$ mit den gegebenen Abklingzeiten werden berechnet.

```

'PROCEDURE'GEW(E,F,FE,NN,PAR,N,S,CASE,FLUP),,
'ARRAY'E,F,FE,PAR,, 'INTEGER'NN,S,, 'LABEL'FLUP,, 'BOOLEAN'CASE,,
'BEGIN'COMMENT' BESTIMMUNG DER GEWICHTE NACH DER METHODE DER KLEINSTEN
        QUADRATE MIT ITERATIVER VERBESSERTUNG,,
'ARRAY'MA(/1.,N,1.,N/),R,WE(/1.,N/),EEX(/1.,N,1.,NN/),
        FMA(/1.,N,1.,ENTIER(NN/S/)),DI,RES,WA(/1.,N/),W(/1.,ENTIER(NN/S/)),
'REAL'XX,, 'INTEGER'ED,, ED.=ENTIER(NN/S/),,

'FOR'I.=1'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
'COMMENT'BERECHNUNG DER ABLINGKURVEN BEI VORGEGBENER ABLINGZEIT,,
        EEX(/1,1/).=1., XX:=EXP(-1/PAR/(2*I/)),,
        'IF'XX'GREATER'3'THEN'BEGIN'
                PRINT('UEBERLAUF IN GEW'),, 'GO TO'FLUP,,
                'END',,
        'FOR'J.=2'STEP'1'UNTIL'NN'DO'EEX(/1,J/).=EEX(/1,J-1/)*XX,,
        'END'I,,

'FOR'I.=1'STEP'1'UNTIL'N'DO'
'BEGIN'
        'FOR'J.=1'STEP'1'UNTIL'ED'DO'
                'BEGIN'
                        L.=J*S,, FMA(/1,J/).=E(/L/),,
                        'IF'1'EQUAL'1'THEN'
                                W(/J/).='IF'CASE'THEN'E(/L/)*ROOT(/L/)'ELSE'E(/L/),,
                        'FOR'K.=1'STEP'1'UNTIL'L-1'DO'
                                FMA(/1,J/).=FMA(/1,J/)+EEX(/1,K/)*E(/L-K/),,
                        'END'J,,
                'END'I,,

LOESCH(FE,O),,
'FOR'I.=1'STEP'1'UNTIL'N'DO' 'BEGIN'
'FOR'J.=1'STEP'1'UNTIL'NN'DO'FE(/I/).=FE(/I/)+EEX(/1,J/)*E(/NN-J+1/),,
        'END'I,,

'IF'NOT'FALL'OR'NOT'CASE 'THEN' 'BEGIN'
'COMMENT'ALFSTELLUNG DER NORMALGLEICHUNGEN,,

'IF'1'EQUAL'1'THEN'
'BEGIN' XX.=FMA(/1,1/),,
        'FOR'J.=2'STEP'1'UNTIL'ED'DO'
                'BEGIN'
                        FMA(/1,1/).=FMA(/1,1/)+FMA(/1,J/)*FMA(/1,J/)/F(/J*S/),,
                        XX.=XX+FMA(/1,J/),,
                'END'J,,
        XX.=XX/FMA(/1,1/),,
        'FOR'J.=1'STEP'1'UNTIL'NN'DO'SP(/J/).=XX*FMA(/1,J/),,
        'GO TO'END1
'END'N = 1.,

```

```

FOR I.=1 STEP 1 UNTIL N'DO
  BEGIN
    FOR J.=1 STEP 1 UNTIL I'DO
      BEGIN
        MA(I,J/)=0.
        FOR K.=1 STEP 1 UNTIL ED'DO MA(I,J/)=MA(I,J/)+
          FMA(I,K/)*FMA(J,K/)/K(K/).
        IF J'LESS I THEN MA(J,I/)=MA(I,J/).
      END J.
      RM(I/)=0.
      FOR J.=1 STEP 1 UNTIL ED'DO RM(I/)=IF CASE THEN
        RM(I/)+FMA(I,J/)/ROOT(J*S/)/ELSE FMA(I,J/)+RM(I/).
    END J.
  END I.
  COMMENT LÖSUNG DER NORMALGLEICHUNGEN MIT ITERATIVER VERBESSERUNG.
  CHDET1(N,MA,DI,S1,S2,NPOS).
  I.=-1. NPOS. IF I'NOT EQUAL -1 THEN
    BEGIN PRINT('GEWICHTSMATR. NICHT POS. DEF.'). GOTO FLUP END.
  J.=0. CHSCL1(N,MA,DI,X,WE).
  BETTER. SRESID(N,MA,RM,WE,RES). CHSCL1(N,MA,DI,RES,WA).
  ERROR.=FALSE. J.=J+1.
  FOR I.=1 STEP 1 UNTIL N'DO
    BEGIN
      WE(I/)=WE(I/)+WA(I/).
      IF ABS(WA(I/)/WE(I/))'GREATER 9 THEN ERROR.=TRUE.
    END.
    IF ERROR'AND J'LESS 10 THEN GO TO BETTER.
  FOR I.=1 STEP 1 UNTIL N'DO PAR(/2*I-1/).=WE(I/).
  COMMENT FEHLER DER ANPASSUNG.
  X.=0. FOR I.=1 STEP 1 UNTIL ED'DO
    X.=IF CASE THEN X+F(I*S/)/ROOT(I*S/)/ELSE X+F(I*S/).
  FOR J.=1 STEP 1 UNTIL N'DO X=X-RM(J/)*WE(J/). X.=SQRT(X/(ED-1)).
  COMMENT ABKLINGFUNKTION BERECHNET MIT DEN GEFUNDENEN GEWICHTEN
    UND GEGEBENEN ABKLINGZEITEN.
  IF I'NOT CASE THEN
    FOR I.=1 STEP 1 UNTIL ED'DO
      BEGIN
        L.=I*S. SP(L/)=0.
        FOR J.=1 STEP 1 UNTIL N'DO SP(L/)=SP(L/)+WE(J/)*FMA(J,I/).
      END I.
    END NOT FALL.
  END.
  END GEW.

```

Die Werte der Abklingzeiten und Gewichte werden jetzt dazu benutzt, die Momente über T_m hinaus zu extrapolieren.

Diese Korrekturen ergeben sich zu

$$\hat{\mu}_k = \sum_{j=1}^N \alpha_j f_j(T_m) \exp \frac{T_m}{\tau_j} \int_{T_m}^{\infty} t' \exp \left(-\frac{t'}{\tau_j} \right) dt' = \sum_{j=1}^N \alpha_j f_j \tau_j^k \quad (115)$$

die auf die folgende Weise berechnet werden. Die Integrale

I_j^k erhält man durch die schon beschriebene Rekursion.

PAR (V) ist jeweils die Abklingzeit und PAR (U) das

dazugehörige Gewicht. DMUK (I) entspricht $\hat{\mu}_k$

```

'COMMENT' ITERATIVE VERBESSERUNG DER MOMENTE UND ABKLINGZEITEN.,
ITER., LCESCH(DMUK,C),, S1:=0., 'FOR' I:=1 'STEP' 1 'UNTIL' 'RICE'
'BEGIN' U:=2*L-1., V:=2*L., X1:=PAR(/U/)*FE(/L/),,
DM(/O/),=PAR(/V/),,
DMUK(/C/),=PAR(/V/)*X1 +DMUK(/O/),, S1:=S1+X1,,
'FOR' I:=1 'STEP' 1 'UNTIL' 'RR'DO'
'BEGIN' 'COMMENT' KORREKTUR DER MOMENTE DURCH EXTRAPOLATION.,
DM(/I/),=(MM*I+I*DM(/I-1/))*PAR(/V/),,
DMUK(/I/),=DMUK(/I/)+DM(/I/)*X1,,
'END' I.,
'END' L.,

```

Mit den neuen Momenten wird das Gleichungssystem nach

dem Satz der G_s aufgelöst. Durch die Normierung der

Momente haben die G_s die Größenordnung von 1.

$$\begin{aligned}
 \hat{\mu}_0 &= G_1 \hat{m}_0 \\
 \hat{\mu}_1 &= G_1 \hat{m}_1 + G_2 \hat{m}_0 \\
 \hat{\mu}_2/2! &= G_1 \hat{m}_2 + G_2 \hat{m}_1 + G_3 \hat{m}_0 \\
 \hat{\mu}_3/3! &= G_1 \hat{m}_3 + G_2 \hat{m}_2 + G_3 \hat{m}_1 + G_4 \hat{m}_0 \\
 &\vdots
 \end{aligned} \quad (116)$$

Aus dem Gleichungssystem

$$G_{N+1} = G_N \beta_1 + \dots + \beta_N G_1$$

(117)

$$G_{2N} = G_{2N-1} \beta_1 + \dots + \beta_N G_N$$

werden die Koeffizienten β_i des Polynoms bestimmt, dessen Wurzeln die gesuchten neuen Näherungen für die Abklingzeiten sind. (Im Programm entspricht N die Zahl R.)

```

'FOR'I.=1'STEP'1'UNTIL'R'DO'
  'BEGIN' 'COMMENT'LOESUNG DER ABKLINGZEITENMATRIX NACH PRONY,,
  'FOR'J.=1'STEP'1'UNTIL'R'DO'MAT(/I,J/).=G(/I-J+R/),,
  RMAT(/I/).=G(/R+I/),,
  'END'I,,
  'LINGL(R,MAT,RMAT,FE,FLOP),, U.=0.,
  MARK2.,'FOR'I.=1'STEP'1'UNTIL'R'DO'
    'BEGIN'
    'FOR'J.=1'STEP'1'UNTIL'R'DO'MAT(/I,J/).=G(/I-J+R/),,
    RMAT(/I/).=G(/R+I/),,
    'END'I,,
    TRIRESID(R,MAT,RMAT,FE,DEV,'FALSE'),, ERROR,='FALSE',,
    'LINGL(R,MAT,DEV,DG,FLOP),,
    'FOR'I.=1'STEP'1'UNTIL'R'DO'
      'BEGIN'
      'IF'ABS(DG(/I/)/FE(/I/))'GREATER'1-9'THEN'ERROR,='TRUE',,
      FE(/I/).=FE(/I/)+DG(/I/),,
      'END'I,,
      'IF'U'EQUAL'10'THEN'PRINT('SCHLECHTE KONVERGENZ BEI MARK2'),,
      U.=U+1., 'IF'ERROR'AND'U'LESS'10'THEN'GO TO'MARK2,,

```

Die Polynome werden mit Standard-Prozeduren gelöst. Die Normierungen werden durch Multiplikation mit $\Delta t \cdot \tilde{\tau}$ wieder rückgängig gemacht und die Amplituden wieder mit Hilfe der Normalgleichungen bestimmt. Dieses Verfahren wird so lange wiederholt, bis sich zwei Näherungen um weniger als 1 % unterscheiden.

5.2. Präparation von Rinderherzmitochondrien

Die Präparation entspricht der am Institut üblichen Prozedur /43/.

Ein Herz von einem frisch geschlachteten Rind wird sorgfältig von Sehnen und Fett befreit, in kleine Würfel geschnitten und dann in einer Lösung von 0,25 M Succrose und 10 mM EGTA¹, pH 7.2 gewaschen. EGTA komplexiert störende Metallionen. Das Fleisch wird mit einem Fleischwolf zerkleinert. Mengen von 250 gr werden in einem Mixgerät mit 0,25 M Succrose, 20 mM TRIS² - HCl, pH 7.2 auf 1 l aufgefüllt und kurz mit dem Mixer homogenisiert. Der pH-Wert wird dabei beobachtet und gegebenenfalls mit 1 M TRIS korrigiert. Zum Homogenat werden jetzt 0,5 mg Subtilisin pro Gramm Fleisch zugegeben und danach wird 10 Minuten gut durchgerührt. Subtilisin ist eine Proteinase, die die Zellwände aufspaltet. Das Homogenat wird dann 20 Minuten mit 600 g zentrifugiert. Der Überstand wird durch 4-lagiges Käsetuch gefiltert und wieder 20 Minuten mit 5000 g zentrifugiert. Das auf dem Überstand schwimmende Fett wird sorgfältig entfernt und der Überstand dekantiert. Die Mitochondrien bilden den Niederschlag, und dieser wird jetzt in 0,25 Succrose, 20 mM TRIS - HCL pH 7.2 aufgenommen und erneut mit 500 g 20 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wird dann möglichst konzentriert aufgenommen (ca. 50 mg Protein/ml Lösung).

1) EGTA = Ethleneglycol - bis (2 - aminomethyl)
- N, N'-tetraacetic acid

2) TRIS = Tris (hydroxymethyl) aminomethane

5.3. Die Präparation von 9-Anthracenmaleinimid

Die Präparation des 9-Anthracenmaleinimid ist der Präparation des N-(3-Pyren)maleinimid /44/ sehr ähnlich.

1. Schritt: 9-Nitroanthracen

9-Nitroanthracen wird nach Dimroth /45/ durch Einwirkung von 8 ml konzentrierter HNO_3 auf 20 g in 80 ml konzentrierter Essigsäure gelöstes Anthracen synthetisiert. Das Produkt wird aus kochender konzentrierter Essigsäure rekristallisiert.

2. Schritt: 9-Aminoanthracen

9-Aminoanthracen wird nach Meisenheimer /46/ durch Reduktion mit Sn_2Cl_2 in 9-Aminoanthracen umgewandelt. Dazu wird 1 g Nitroanthracen in 20 ml Essigsäure kochend gelöst, und dazu wird eine warme Lösung von 10 g Sn_2Cl_2 in 10 ml HCl gegeben. Der Niederschlag wird gewaschen und mit verdünntem Ammoniak zersetzt. Das gelbe Aminoanthracen wird mit Äthanol aufgenommen und durch Zusatz von Wasser rekristallisiert.

3. Schritt: 9-Anthracenmaleinsäure

3 g Aminoanthracen werden in 30 ml kaltem Tetrahydrofuran und 1,6 g Maleinsäureanhydrid werden in 15 ml kaltem Tetrahydrofuran gelöst. Im Eisbad werden beide Lösungen vereinigt und mindestens 24 Stunden bei 5°C gerührt. Es bildet sich ein hellgelber Niederschlag, der abgefiltert und mit Tetrahydrofuran gewaschen wird.

4. Schritt: 9-Anthracenmaleinimid

1 g 9-Anthracenmaleinsäure wird zu einer Mischung von 20 g Essigsäureanhydrid und 60 mg NaOAcetat gegeben. Die Suspension wird 2 Stunden bei 75°C gerührt. Die jetzt

klare und hellgelbe Lösung wird langsam abgekühlt und in 50 ml konzentrierte NaHCO_3 Lösung gegossen. Der Niederschlag wird mit NaHCO_3 gewaschen.

In der Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Chloroform - Dioxan - Eisessig 65 - 25 - 4) zeigten sich drei Fraktionen, die alle fluoreszierten, sich aber in den Fluoreszenzspektren nicht unterscheiden. Die Intensität der zweiten Fraktion überwiegt jedoch bei weitem. Nach der Trennung durch Chromatographie hemmte auch nur die zweite Fraktion das Anschwellen von Rattenlebermitochondrien in $\text{NH}_4 - \text{P}_i$ Lösungen /47/. Dies ist ein sicheres Indiz, daß die synthetisierte Substanz an SH-Gruppen bindet. Auch zeigte sich nur mit der zweiten Fraktion eine Fluoreszenzübertragung vom Tryptophan des Serum Albumins auf den Fluoreszenzlabel.

6. Literaturverzeichnis

1. Klingenberg, M., Pfaff, E. (1965), In: Proc. of the Symp. on the "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria"
Amsterdam (Elsevier) S. 180
2. Pfaff, E., Klingenberg, M., Eur. J. Biochem. 6, 66 (1968)
3. Ward, D. C., J. Biol. Chem. 244, 3243, (1969)
4. Dehler, J., Dörr, F., Z. angew. Physik, 19, 147 (1965)
5. Tumerman, L. A., J. Phys. (USSR), 4, 151 (1941)
6. Bolinger, L. M., Thomas, G. F., Rev. Sci. Instr. 32, 1044 (1963)
7. Koechlin, Y., Theses, Universität Paris 1961
8. ORTEC Application Note An 35, 1971
9. ORTEC Manual für Modell 435 - Constant Fraction Timing Discriminator
10. Davis, C. C., King, T. A., J. Phys. A, 3, 101 (1970)
11. Davis, C. C., King, T. A., Rev. Sci. Instr. 41, 407 (1970)
12. Coates, P. B., J. Sci. Instr., 1, 878, (1968)
13. Coates, P. B., J. Phys. E, 4, 148, (1971)
14. Heiss, Doktorarbeit TU München 1972
15. Wahl, Ph., Auchet, J. C., Donzel, B., Rev. Sci. Instr. 45, 28 (1974)
16. Munro, I. J., J. Phys. E., 1, 147 (1968)
17. Helman, W. P., Int. J. Radiat. Phys. Chem. 3, 283 (1971)
18. Knight, A. E., Selinger, B. K., Spectrochim. Acta 27A, 1223 (1971)
19. Isenberg, I., Dyson, D., Biophys. J. 9, 1337 (69)
20. Isenberg, I., Dyson, D., Hanson, R., Biophys. J. 13, 1090 (1973)
21. Isenberg, I., J. Chem. Phys. 59, 5696, (1973)
22. Ware, R. W., Doemeny, L. J., Nemzek, T. L., J. Phys. Chem. 77, 2038 (1973)
23. Grinvald, A., Steinberg, I. Z., Anal. Biochem. 59, 583 (1974)
24. Marquardt, D. W., J. SIAM 11, 431 (1963)
25. Perrin, F., J. Phys. et le Radium 7, 390 (1929)

26. Jablonski, A., Z. Physik. 96, 236 (1935)
27. Perrin, F., Ann. de Phys. 12, 169, (1929)
28. Jablonski, A., Z. Physik 95, 53 (1935)
29. Memming, R., Z. Physik. Chemie (Frankfurt) 28, 168 (1961)
30. Weber, G., J. Chem. Phys. 55, 2399 (1971)
31. Ehrenberg, M., Rigler, R., Chem. Phys. Lett. 14, 539 (1972)
32. Weber, G., Biochem. J. 51, 145 (1952)
33. Velick, S. F., J. Biol. Chem. 233, 1455 (1958)
34. Förster, Th., Ann. d. Physik 2, 55, (1948)
35. Förster, Th., in Fluoreszenz Organischer Verbindungen
Göttingen, 1951
36. Gaviola, E., Pringsheim, P., Z. Physik 24, 24 (1924)
37. Förster, Th., Z. f. Naturf., 5, 321 (1949)
38. Steinberg, I. Z., J. Chem. Phys. 48, 2411 (1968)
39. Elkana, Y., Feitelson, J., Katchalski, E.
J. Chem. Phys. 48, 2399 (1968)
40. Shinitzky, M., Dianoux, A. C., Glitler, C., Weber, G.,
Biochem. 10, 2106 (1971)
41. Ward, D. C., Reich, E., Stryer, L.,
J. Biol. Chem. 244, 1228 (1969)
42. Hildebrand, F. in: Introduction to Numerical Analysis
New York 1956
43. Scherer, B., Klingenberg, M. Biochem. 13, 161 (1974)
44. Weltman, J. K., Szaro, R. P., Frackelton, A. R.,
Dowben, R. M., J. Biol. Chem. 248, 3173 (1973)
45. Dimroth, Ber. 34, 221 (1901)
46. Meisenheimer, Ber. d. chem. G. 33, 3548 (1900)
47. Klingenberg, M., Durand, R., Guerin B.
Eur. J. Biochem. 42, 135 (1974)
48. Riccio, P., Aquila, H., Klingenberg, M.,
FEBS Letters, im Druck

7. Verzeichnis benutzter Abkürzungen

A Anisotropie der Fluoreszenz. Sie ist definiert durch

$$A = \frac{I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + 2 I_{\rightarrow}}$$

wobei $I_{\uparrow}$ und $I_{\rightarrow}$ die senkrechte und waagerechte Komponente der Intensität sind.

A_b Fluoreszenzanisotropie eines Moleküls, dessen Beweglichkeit durch die Bindung an ein Protein eingeschränkt ist.

A_f Fluoreszenzanisotropie eines Moleküls, das sich frei in der Lösung bewegen kann.

A_o Fluoreszenzanisotropie eines ruhenden Moleküls
 A_o kann angenähert durch Messungen der Anisotropie in hochviskosen Lösungen (wie z.B. Glycerin) bestimmt werden.

A_{ob} Grenzwert der mittleren Fluoreszenzanisotropie freier und gebundener Moleküle bei großem Überschuß des möglichen Bindungspartners.

α Seite 10: Eigenpolarisationsgrad der Meßapparatur
 Seite 12, 13: $\alpha = \omega \cdot t$ zeitabhängige Stellung des rotierenden Analysators

α_n Amplituden der Exponentialfunktionen in der Fluoreszenzabklingfunktion.

AdN Gemeinsame Bezeichnung für die Adennucleotide AMP, ADP und ATP

AMP Adenosinmonophosphat

ADP Adenosindiphosphat

ATP	Adenosintriphosphat. ATP kann durch Abgabe einer Phosphatgruppe exotherm in ADP übergehen. Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsoszillator eines Moleküls
C	Konzentration in Mol / l
c_b	Konzentration der gebundenen Moleküle
c_f	Konzentration der freien Moleküle
$E(t)$	Zeitlicher Verlauf des Blitzes
E	Seite 28: Anfangsenergie eines von der Photokathode eines Photomultipliers emittierten Elektrons. Auf allen anderen Seiten: Darstellung des zeitlichen Verlaufes des Blitzes durch einen Vektor, der aus äquidistanten Meßpunkten $E(t_i)$ gebildet wird.
E_o	Totale Enzymkonzentration
E_f	Konzentration des freien Enzyms
E_b	Konzentration des gebundenen Enzyms
$E(\nu)$	Molare dekadische Extinktion
F	Seite 29: Vektor der Fluoreszenzfunktion, der aus den zeitlich äquidistanten Meßpunkten $F(t_i)$ gebildet wird. Auf späteren Seiten: Relative Änderung der Fluoreszenzintensität durch die Bindung des Moleküls an ein großes Protein
$f(t)$	Abklingfunktion der Fluoreszenz. $f(t)$ ist im einfachsten Fall eine Exponentialfunktion
f	Vektordarstellung von $f(t)$

$f_A(\nu)$	Quantenspektrum der Fluoreszenz des Moleküls A
f_b	Relativer Beitrag der gebundenen Moleküle zur Gesamtintensität
f_f	Relativer Beitrag der freien Moleküle zur Gesamtintensität
f_i	Relativer Beitrag der i - ten Komponente zur Gesamtintensität
FCCP	Carbonyl cyanide p - trifluoromethoxyphenylhydrazine FCCP ist ein Entkoppler, der die Bindung der Neubildung des ATP an die Atmung aufhebt. Nach der Zugabe von FCCP atmen die Mitochondrien ohne ATP zu synthetisieren.
FMP	Formycinmonophosphat
FDP	Formycin-diphosphat. FMP und FDP können AMP und ADP in sehr vielen enzymatischen Reaktionen ersetzen.
FDP_o	Totale FDP - Konzentration
$I_{\uparrow}, I_{\rightarrow}$	Komponente der Fluoreszenzintensität senkrecht bzw. parallel zur Ebene aus Einstrahlungs- und Beobachtungsrichtung
K	Dissoziationskonstante
α	Orientierungsfaktor bei der Übergangswahrscheinlichkeit der Fluoreszenzübertragung
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid. NADH kann durch Abgabe von Wasserstoff in NAD übergehen. NADH fluoresziert, NAD dagegen nicht
n_a, n_e	Übergangswahrscheinlichkeiten der Emission bzw. der Absorption

P Polarisation der Fluoreszenz. Sie ist definiert durch

$$P = \frac{I_{\uparrow} - I_{\rightarrow}}{I_{\uparrow} + I_{\rightarrow}}$$

und zwischen der Polarisation und der Anisotropie der Fluoreszenz besteht die Beziehung

$$A = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right)^{-1}$$

P_i Anorganisches Phosphat

P_o Fluoreszenzpolarisation eines ruhenden Moleküls

Q Quantenausbeute

R_o Kritischer Abstand der Fluoreszenzübertragung.
Befinden sich die Moleküle im Abstand R_o, so ist die Wahrscheinlichkeit der Emission gleich der Wahrscheinlichkeit der Fluoreszenzübertragung

O(ν) Energiedichte der einfallenden Strahlung

τ Tatsächlich meßbare Fluoreszenzabklingzeit

τ_o Fluoreszenzabklingzeit ohne strahlungslose Übergänge

τ_R Abklingzeit der Anisotropie. In der Zeit τ_R dreht sich ein Molekül um 33°.

W_o, W₁ Energie der reinen Elektronenzustände

w_k, w₁ Kernschwingungsenergien

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 7.3.1945 in Hahnenklee - Bockswiese, Kreis Clausthal - Zellerfeld als Sohn des Georg Graue und seiner Frau Gerda Graue, geb. Hellmund. Ich besuchte die dortige Volksschule bis 1953, als meine Eltern nach Homberg, Kreis Moers, umzogen. 1955 bestand ich die Aufnahmeprüfung am dortigen mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium, das ich bis zum Abitur am 19.2.1964 besuchte. Im Sommersemester 1964 begann ich das Studium der Physik an der Universität Köln und wechselte dann zum Wintersemester 1965/66 zur Universität München über. Vom Wintersemester 1969/70 bis zum Wintersemester 1970/71 machte ich am Lehrstuhl Prof. Rollwagen meine Diplomarbeit mit dem Thema: Bau einer Kristallziehapparatur, die ich am 24.3.1971 mit der Note "sehr gut" in der Diplomprüfung beendete. Im September 1971 begann ich am Institut für physikalische Biochemie meine Dissertation bei Prof. Klingenberg.



